

Reaktionen auf der Dünnschichtplatte – eine Mikromethode für analytische und präparative Spezialprobleme

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Harald Friedrich Schütz
aus Ingelheim/Rhein

Marburg/Lahn 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Reaktionen auf der Dünnschichtplatte – eine Mikromethode für analytische und präparative Spezialprobleme

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



vorgelegt von
Harald Friedrich Schütz
aus Ingelheim/Rhein

Marburg/Lahn 1977

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am 24.11.1977

Tag der mündlichen Prüfung: 13./14.12.1977

Berichterstatter: Prof.Dr.S.Ebel

Mitberichterstatter: Prof.Dr.M.Haake

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.M.Geldmacher-von Mallinckrodt
(Erlangen)

Mitberichterstatter: Prof.Dr.F.R.Preuß (Freiburg i.B.)



Die vorliegende Dissertation entstand durch eine Zusammenarbeit des Instituts für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn (Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.K.Hartke) mit dem Institut für Rechtsmedizin (Leitung: Prof.Dr.Dr.G.Schewe) im Zentrum für Ökologie (Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr.E.G.Beck) des Fachbereichs Humanmedizin (Dekan: Prof.Dr.D.Ringleb) der Justus Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von

Herrn Professor Dr.Siegfried Ebel.

An dieser Stelle sei allen gedankt, die diese Arbeit förderten und unterstützten, insbesondere Herrn Prof. Dr.Dr.h.c.H.Böhme, Herrn Dr.D.Post, Herrn Prof.Dr. Fr.-R.Preuß (Freiburg i.Br.) und Herrn Prof.Dr.Dr. G.Schewe.

Für alle Hilfe, jegliche Unterstützung und die fruchtbare Zusammenarbeit im Arbeitskreis möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0.0.0.0. <u>Vorbemerkungen zur Konzeption der Arbeit</u>	1
2.0.0.0.0. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	4
3.0.0.0.0. <u>Reaktionen auf Dünnschichtchromatogrammen für analytische Aufgabenstellungen</u>	7
3.1.0.0.0. Derivatisierung durch Licht (physikalische Methoden)	7
3.1.1.0.0. Einwirkungsmöglichkeit sichtbaren Lichts, dargestellt am Beispiel der Umwandlung von Nifedipin	7
3.1.1.1.0. Allgemeine Ausführungen (Biotransformation)	7
3.1.1.2.0. Durchgeführte Untersuchungen	9
3.1.1.2.1. Allgemeine Daten	9
3.1.1.2.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	10
3.1.1.2.3. Prüfung der Lichtstabilität von Nifedipin	14
3.1.1.2.4. Gaschromatographische Untersuchungen	17
3.1.1.2.5. Elektronenanregungsspektren	19
3.1.1.2.6. Infrarotspektren	21
3.1.1.2.7. Massenspektren	24
3.1.1.3.0. Zusammenfassung der Ergebnisse	26
3.1.1.4.0. Diskussion der Ergebnisse	26
3.1.2.0.0. Photolytische Desalkylierung N-1-alkylierter 1,4-Benzodiazepine	27
3.1.2.1.0. Einleitung	27
3.1.2.2.0. Problemstellung	33
3.1.2.3.0. Versuche zur photolytischen Desalkylierung	33
3.1.2.3.1. Ermittlung günstiger Belichtungszeiten	38

3.1.2.4.0.	Prinzip der Nachweismethode	39
3.1.2.4.1.	Praktische Durchführung	40
3.1.2.4.2.	Ergebnisse	43
3.1.2.5.0.	Diskussion der Ergebnisse	46
3.2.0.0.0.	Derivatisierung durch chemische Agen- tien	48
3.2.1.0.0.	Hydrolytische Spaltung	48
3.2.1.1.0.	Allgemeine Ausführungen	48
3.2.1.2.0.	Untersuchte Wirkstoffe	50
3.2.1.2.1.	Benzodiazepine	50
3.2.1.2.2.	p-Aminophenolderivate	54
3.2.1.2.3.	Pyrazolonderivate	54
3.2.1.3.0.	Methodik	58
3.2.1.4.0.	Ergebnisse	61
3.2.1.5.0.	Diskussion der Ergebnisse	64
3.2.2.0.0.	Reduktion und Acetylierung, dargestellt am Beispiel der Trennung von Clonazepam und Nitrazepam	66
3.2.2.1.0.	Einleitung	66
3.2.2.2.0.	Literaturübersicht	69
3.2.2.3.0.	Biotransformation von Clonazepam und Nitrazepam	71
3.2.2.4.0.	Präparation wichtiger Metaboliten des Clonazepam	74
3.2.2.5.0.	Spektroskopische Daten von Clonazepam und Nitrazepam sowie einigen Hauptmeta- boliten und Hydrolysederivaten	77
3.2.2.5.1.	UV-Spektren	77
3.2.2.5.2.	IR-Spektren	85
3.2.2.5.3.	Massenspektren	85

3.2.2.6.0.	Günstige Extraktionsparameter für die Isolierung aus biologischem Material	85
3.2.2.7.0.	Dünnschichtchromatographische Trennverfahren	86
3.2.2.7.1.	Screening-Test auf Clonazepam und Nitrazepam	88
3.2.2.7.2.	Screening-Test auf 7-Aminoclonazepam und 7-Aminonitrazepam als Hauptmetaboliten	90
3.2.2.7.3.	Methodik zur Unterscheidung von Clonazepam und Nitrazepam mit Hilfe der TRT-Technik und Reaktionschromatographie	93
3.2.2.8.0.	Ergebnisse	102
3.2.2.9.0.	Diskussion der Ergebnisse	102
3.2.3.0.0.	Derivatisierung durch andere Reaktionen	105
3.2.3.1.0.	Halogenierung	105
3.2.3.2.0.	Nitrierung	106
3.2.3.3.0.	Oxydation (insbesondere N-Oxid und Sulfoxidbildung)	108
3.2.3.4.0.	Hydroxylierung	109
3.2.3.5.0.	Diazotierung und Azokupplung	109
3.2.3.6.0.	Umlagerungen	109

4.0.0.0.0.	<u>Reaktionen auf der DC-Platte für präparative Zwecke</u>	110
4.1.0.0.0.	Allgemeine Ausführungen	110
4.2.0.0.0.	Darstellung von Nefopam-N-Oxid aus Nefopam	111
4.2.1.0.0.	Zur Analytik von Nefopam, Nor-Nefopam und Nefopam-N-Oxid	111
4.2.1.1.0.	Allgemeines (Struktur, allgemeine Daten)	113
4.2.1.2.0.	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	114
4.2.1.2.1.	Qualitative Trennung	114
4.2.1.2.2.	Quantitative Bestimmung durch Remissionsmessung	118
4.2.1.3.0.	Gaschromatographische Untersuchungen	119
4.2.1.4.0.	Spektroskopische Untersuchungen	120
4.2.1.4.1.	UV-Spektren	120
4.2.1.4.2.	IR-Spektren	122
4.2.1.4.3.	Massenspektren	123
4.2.1.5.0.	Untersuchungen zur Biotransformation	124
4.2.1.5.1.	Extraktionsgang	125
4.2.1.5.2.	Identifizierung	127
4.2.1.5.3.	Ergebnisse	130
4.2.2.0.0.	Bildung von Nefopam-N-Oxid auf der DC-Platte	132
4.2.2.1.0.	Praktische Durchführung	132
4.2.2.2.0.	Ergebnisse	133
4.2.3.0.0.	Versuche zur photolytischen Desalkylierung von Nefopam	134

4.3.0.0.0.	Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetaminoflunitrazepam	136
4.3.1.0.0.	Zur Biotransformation von Flunitrazepam	136
4.3.1.1.0.	Konventionelle Synthese von 7-Amino- flunitrazepam	
4.3.1.2.0.	Konventionelle Synthese von 7-Acetamino- flunitrazepam	137
4.3.2.1.0.	Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam auf der DC-Platte	138
4.3.2.2.0.	Darstellung von 7-Acetaminoflunitrazepam auf der DC-Platte	140
4.3.3.0.0.	Ergebnisse, Vergleich und Diskussion	142
4.4.0.0.0.	Darstellung von N-1-Desalkylflunitrazepam (=Nor-Flunitrazepam)	142
4.4.1.0.0.	Allgemeine Ausführungen	142
4.4.2.0.0.	Versuche zur photolytischen Desalkylierung als Lösungsreaktion	143
4.4.3.0.0.	Photolytische Desalkylierung von Flunitrazepam unter präparativen Aspekten auf der DC-Platte	144
4.4.4.0.0.	Ergebnisse, Vergleich und Diskussion	148
4.5.0.0.0.	Darstellung von 3-Hydroxybenzodiazepinen	149
4.5.1.0.0.	Bedeutung der 3-Hydroxyderivate für die Biotransformation und Analytik der Benzo- diazepine	149
4.5.2.0.0.	Überblick über Synthesemöglichkeiten	151
4.5.2.1.0.	Darstellung der N-Oxide	152
4.5.2.1.1.	Oxydation mit Wasserstoffperoxid	152
4.5.2.1.2.	Bildung aus Chinazolin-N-3-Oxid unter Ringerweiterung	152
4.5.2.1.3.	Selektive Oxydation mit m-Chlorperbenzoe- säure	153

4.5.2.2.0.	Darstellung der 3-Acetoxyverbindung	153
4.5.2.3.0.	Hydrolyse der 3-Acetoxyverbindung zum 3-Hydroxyderivat	153
4.5.3.0.0.	Praktische Durchführung als Lösungsreaktionen	154
4.5.3.1.0.	Darstellung des N-Oxids mit m-Chlorperbenzoesäure	154
4.5.3.1.1.	Modifikation nach Craig und Purushothaman	154
4.5.3.1.2.	Modifikation nach Delia, Olsen und Brown	155
4.5.3.1.3.	Modifikation nach Hansen und Boyd	155
4.5.3.1.4.	Modifikation nach Sigg und Toth	155
4.5.3.1.5.	Vergleichende Betrachtung der Brauchbarkeit der einzelnen Modifikationen für die Bildung von Benzodiazepin-N-Oxiden	156
4.5.3.1.6.	Durchführungsvorschrift für die erarbeitete Methode zur Darstellung von Benzodiazepin- N-Oxiden	158
4.5.3.2.0.	Darstellung der 3-Acetoxyverbindung aus den N-Oxiden	159
4.5.3.3.0.	Hydrolyse zur 3-Hydroxyverbindung	160
4.5.3.3.1.	Alkalische Hydrolyse	160
4.5.3.3.2.	Saure Hydrolyse	164
4.5.4.0.0.	Praktische Durchführung auf der DC-Platte	165
4.5.4.1.0.	Darstellung der Benzodiazepin-N-Oxide	165
4.5.4.2.0.	Darstellung der 3-Acetoxyverbindung	167
4.5.4.3.0.	Darstellung der 3-Hydroxyverbindung	167
4.5.4.4.0.	Ergebnisse und Diskussion	168
4.6.0.0.0.	Spektren	168
5.0.0.0.0.	Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit	180
6.0.0.0.0.	Literaturüberblick zur Analytik der Benzodiazepine	184
7.0.0.0.0.	Literatur	188

1.0.0.0.0. Vorbemerkungen zur Konzeption der Arbeit

Ausgangspunkt für die Planung und Durchführung der vorliegenden Arbeit waren zwei H a u p t k o n z e p t e : Auf der einen Seite interessierte die Durchführungsmöglichkeit chemischer und auch physikalischer Reaktionen a u f dem Sorbens von Dünnschichtchromatogrammen zur Lösung spezieller analytischer und präparativer Problemstellungen. Andererseits sollten analytische Daten und Nachweismöglichkeiten für einige wichtige Neuerscheinungen auf dem Arzneimittelmarkt erarbeitet und erprobt werden.

Beide Konzepte konnten miteinander verknüpft und in der folgenden Arbeit gemeinsam dargestellt werden, wobei als Ordnungsprinzip die Thematik des ersten Konzeptes ("Reaktionen auf der DC-Platte") gewählt wurde. Wie aus der Gliederung ersichtlich ist, werden zunächst einfachere und später kompliziertere Reaktionen, sowie Kombinationen verschiedener Umsetzungen beschrieben und anhand von Anwendungsbeispielen praktischer Bedeutung belegt. Auf präparative Aspekte der Methodik wird insbesondere im zweiten Teil der Arbeit ausführlich eingegangen.

Es schließen sich eine Zusammenstellung und Diskussion der Ergebnisse an.

Obwohl mit dem Thema nicht unmittelbar verbunden, wurden verschiedene Untersuchungsergebnisse, wie z.B. gaschromatographische und spektroskopische Daten, R_f -Werte zahlreicher anderer in Bezug auf die Wirkung verwandter Pharmaka, Präparationsvorschriften für einzelne Metaboliten u.a. in die vorliegende Arbeit

mit einbezogen, da sie einerseits zur Kontrolle der Ergebnisse erforderlich waren und daher dokumentarischer Bestandteil der Dissertation sein müssen, andererseits aber auch allgemein gesehen von chemisch-toxikologischer Bedeutung sind. Eine ausführliche Darstellung wurde daher trotz zwangsläufig damit verbundener Vergrößerung des äußeren Umfanges der Arbeit für vertretbar gehalten, nicht zuletzt auch deshalb, weil analytische Daten z.B. bei Notfallsituationen in der forensischen und klinisch-chemischen Laborpraxis oft schnell verfügbar sein müssen.

Bei den untersuchten Pharmaka handelt es sich ausnahmslos um Wirkstoffe, die auch von forensisch-toxikologischer Bedeutung sind, da sie eine mehr oder weniger ausgeprägte Toxizität besitzen und außerdem, von Nifedipin abgesehen, auch psychotrope Wirkungen zeigen, die insbesondere in Verbindung mit Alkohol von verkehrsmedizinischem Interesse sind.

Die Arbeit behandelt analytische Aspekte folgender Wirkstoffe:

Benzodiazepine (Bromazepam, Chlorazepat, Chlordiazepoxid, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Flurazepam, Lorazepam, Medazepam, Nitrazepam, Oxazepam, Prazepam),
 Metaboliten der obengenannten Benzodiazepine,
 Anilinderivate (Acetaminophen, Acetophenetidin, Bucetin, Lactylphenetidin, Salicylphenetidin),
 Pyrazolone (Amidopyrin, Isopropylaminophenazon, Melaminsulfon, Metamizol),
 Kavain,
 Mazindol,
 Nefopam,
 Nifedipin.

Die Untersuchungen zur Analytik und Biotransformation der vier letztgenannten Wirkstoffe wurden insbesondere auch deshalb eingeleitet, weil entsprechende Ergebnisse nicht oder allenfalls teilweise vorlagen und die Notwendigkeit eines Nachweises im Rahmen von Vergiftungsfällen sich vereinzelt bereits in unserer Laborpraxis erhob (z.B. Abhängigkeit eines Patienten bald nach der Einführung von Nefopam (AJAN^R)).

Folgende Reaktionen konnten auf dem Sorbens der DC-Platte in meist glatter Ausbeute bei oft ungewöhnlich kurzen Reaktionszeiten verifiziert werden:

Hydrolyse,
Halogenierung,
Nitrierung,
Reduktion,
Desalkylierung,
Oxydation (insbesondere N-Oxidbildung),
Acetylierung,
Hydroxylierung,
Diazotierung,
Azo-Kupplung,
Umlagerung (z.B. Rearomatisierung bei Nifedipin).

2.0.0.0.0. Einleitung und Problemstellung

Bereits kurze Zeit nach der Einführung dünn-schicht-chromatographischer Methoden durch Egon S t a h l (1) wurde von ihm selbst und anderen Arbeitsgruppen festgestellt, daß viele Stoffe andere Substanzeigenschaften besitzen, wenn man sie im aktiven Zustand feinsten Verteilung a u f dem Sorbens dünn-schicht-chromatographischer Systeme entweder äußeren Einflüssen wie z.B. Licht, Wärme und Sauerstoff aussetzt oder mit bestimmten Reagentien behandelt:

Stahl (2) führte Modellversuche zur Inaktivierung der Pyrethrine am Wirkungsort durch, wobei er die DC-Platte, nach der Entwicklung der unveränderten Pyrethrine in der ersten Laufrichtung, Lichteinflüssen aussetzte und die entstandenen Folgeprodukte anschließend in der zweiten Dimension trennte. Diese, auch als TRT (= Trennung-Reaktion-Trennung) - Technik bezeichnete Methode konnte auf viele andere analytische Problemstellungen angewandt werden, über die noch zu berichten sein wird (3).

Ebel und Herold (4,5) beobachteten, daß ansonsten relativ stabile Verbindungen wie z.B. Chinin und Thiazobenzodazol auf der Platte sehr leicht verändert werden.

Kofoed et al. (6) führten Phenothiazine durch Behandeln mit Wasserstoffperoxid in ihre entsprechenden Sulfoxide über und erreichten so eine weitere Differenzierung.

De Zeeuw und Wijsbeek (7) gelang es, Thiobarbiturate durch Oxydation am Startpunkt von DC-Platten in die korrespondierenden Sauerstoffderivate umzuwandeln (z.B. Thiopental in Pentobarbital).

Wilk und Taupp (8), Wilk und Brill (9) sowie Wilk et al. (10) berichten über Beobachtungen, denen zufolge in der aktiven Trägerschicht des Sorptionsmittels Produkte entstehen können, die sich in vergleichbaren homogenen Lösungen nur außerordentlich langsam oder überhaupt nicht bilden. Die genannte Arbeitsgruppe vermutet eine Beteiligung des Trägermaterials an der Bildung des Übergangszustandes, wobei es durch die Chemisorption zu einer Veränderung der Energie des Grundzustandes kommen soll.

Chemische Umwandlungen von Ketosteroiden auf der DC-Platte wurden von Wassef und Ma (11) beschrieben; über eine weitere Anwendungsmöglichkeit berichtet Schmid (12).

In früheren eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß gesättigte Barbiturate beim Begasen mit Brom am Startpunkt der Dünnschichtplatte keiner Derivatisierung zugänglich sind, cyclisch-olefinische Barbiturate (z.B. Heptabarbital, Hexobarbital und Cyclobarbital) z w e i Folgeprodukte und in der aliphatischen Seitenkette ungesättigte Vertreter dieser Stoffklasse d r e i oder mehr Derivate bilden, die sich dünnschichtchromatographisch gut differenzieren lassen (13,14,15). Die Brauchbarkeit der Methode erwies sich auch bei anderen Derivatisierungen (16,17,18,19,20,21,22).

Bisher wurden jedoch lediglich einfache Reaktionsabläufe untersucht und vor allem auch präparative Aspekte nicht weiter vertieft.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, auch kompliziertere Derivatisierungen auf der DC-Platte zu verifizieren, um damit analytische Aussagen treffen zu können, die sich deutlich von den mit Lösungsreaktionen erhaltenen Ergebnissen abheben.

Eine besondere Bedeutung sollte jedoch den erarbeiteten Präparationsmöglichkeiten zukommen, wenn es gelingen würde, auch komplizierte Metaboliten von Arzneimitteln in kurzer Zeit und befriedigenden Ausbeuten im substanzsparenden Milligramm- bis Mikrogrammansatz zu synthetisieren.

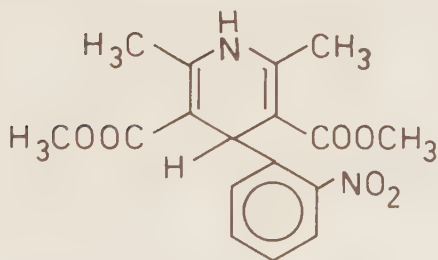
3.0.0.0.0. Reaktionen auf der DC-Platte für analytische Aufgabenstellungen

3.1.0.0.0. Derivatisierung durch Licht (physikal. Methoden)

3.1.1.0.0. Einwirkungsmöglichkeit sichtbaren Lichts, dargestellt am Beispiel der Umwandlung von Nifedipin

3.1.1.1.0. Allgemeine Ausführungen (Biotransformation)

Im Januar 1975 wurde mit Nifedipin (ADALAT^R) ein neuer Koronardilatator in der Bundesrepublik eingeführt, über dessen günstige pharmakologische Eigenschaften verschiedene Arbeitsgruppen bereits 1972 in größerem Umfang berichteten (23 - 42).



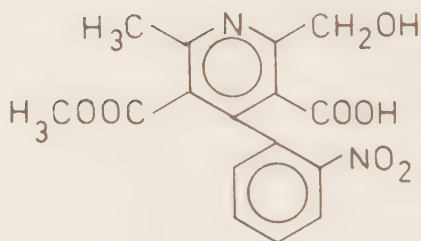
1

Nifedipin

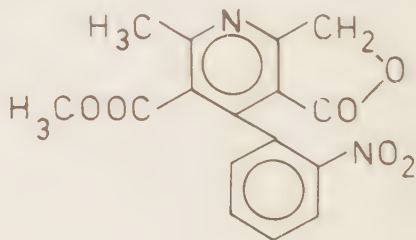
1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(o-nitro-phenyl)-
pyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (Nifedipin)

Untersuchungen zur Pharmakokinetik, Biotransformation und Strukturaufklärung der Metaboliten (43,44) ergaben, daß Nifedipin nach rascher Resorption bei oraler und sublingualer Applikation in Form von Metaboliten überwiegend renal ausgeschieden wird. Im Harn konnten lediglich Spuren des unveränderten Wirkstoffes nachgewiesen werden. Unabhängig von der Dosierung erfolgte die Ausscheidung eines Hauptmetaboliten, der im Gegensatz zur applizierten Substanz eine Säure ist. In neutralem oder alkalischem Harn liegt dieser Hauptmetabolit als Salz vor und ist mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahierbar.

Nach dem Ansäuern des Harnes (pH~1) eignen sich Essigester oder Chloroform als Extraktionsmittel für das Hauptstoffwechselprodukt. Essigester bietet den Vorteil einer weitgehend vollständigen Extraktion, während Chloroform zu reineren Extrakten führt (44). Weitere Untersuchungen ergaben, daß der Hauptmetabolit in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zu einem Nebenmetaboliten stehen muß, dem aufgrund spektroskopischer Daten die Struktur eines Lactons zuerkannt werden konnte:



Hauptmetabolit (Oxycarbonsäure)



Nebenmetabolit (Lacton)

Die hauptsächlichen Metabolisierungsschritte können demnach wie folgt zusammengefaßt werden:

Umsetzung des Dihydropyridinringes zum Pyridinderivat,
Oxidation einer Methylgruppe zur Hydroxymethylgruppe,
Hydrolyse einer Estergruppe zur Carboxylgruppe.

Nach Berichten der Autoren (24,44) wurden alle Versuche unter **A u s s c h l u ß** von **T a g e s l i c h t** mit Natriumdampflampen als Beleuchtungsquelle ausgeführt, da Nifedipin (BAY a 1040) sehr lichtempfindlich ist. Angaben zur Struktur und Analytik der bei Lichtexposition entstehenden Umwandlungsprodukte wurden bisher nicht publiziert. Angesichts der Bedeutung einer genauen Kenntnis dieser Derivate wurden entsprechende Untersuchungen eingeleitet, nicht zuletzt auch im Hinblick darauf, daß bei der Aufarbeitung von biologischem Material (z.B. Mageninhalt) in der chemisch-toxikologischen Laborpraxis etwa im Zusammenhang mit Vergiftungsfällen mit dem Anfall von Asservaten gerechnet werden muß, die längere Zeit lichtexponiert waren. Darüber hinaus ließe sich eine Arbeitsweise unter den weiter oben genannten Bedingungen (Na-Dampf-Licht) im normalen Routinelabor nur mit großem Aufwand verifizieren.

3.1.1.2.0. Durchgeführte Untersuchungen

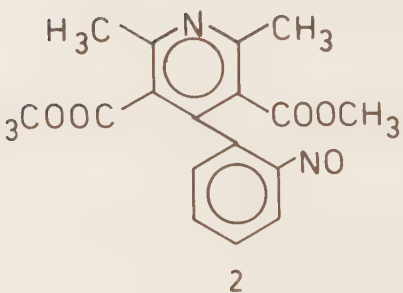
3.1.1.2.1. Allgemeine Daten

MG (Nifedipin): 346,35, Bruttoformel: $C_{17}H_{18}N_2O_6$, grügelbes Pulver, Fp.: 169-170° C, spez. Extinktion in Äthanol abs. bei 235 nm: 490; als Handelsform in Kapseln mit je 10 mg Nifedipin in einem speziellen Lösungsmittelgemisch.

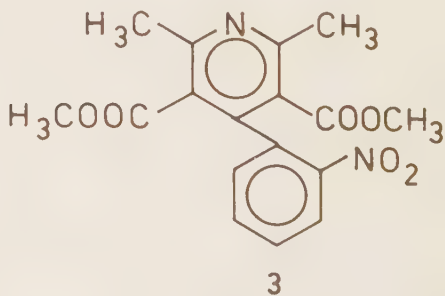
3.1.1.2.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Im Hinblick auf die erhöhte Reaktionsfreudigkeit vieler ansonsten recht inerte Stoffe im Zustand des Chemisorpts auf dem Trägermaterial von Dünnschichtchromatogrammen (4,5,45) vermuteten wir, daß sich Nifedipin wegen seiner instabilen Eigenschaften besonders leicht auf der Platte umwandelt. Als Derivatisierungsreaktion kann man eine Rearomatisierung zur Pyridinverbindung postulieren, die infolge der Mesomeriestabilisierung energetisch begünstigter ist (vgl. auch Metabolisierung).

Als mögliche Umwandlungsprodukte wurden daher die nachstehend in ihrer Struktur wiedergegebenen Derivate (rearomatisierte Nitro- bzw. Nitrosoverbindung) bei den chromatographischen und spektroskopischen Untersuchungen miterfaßt.



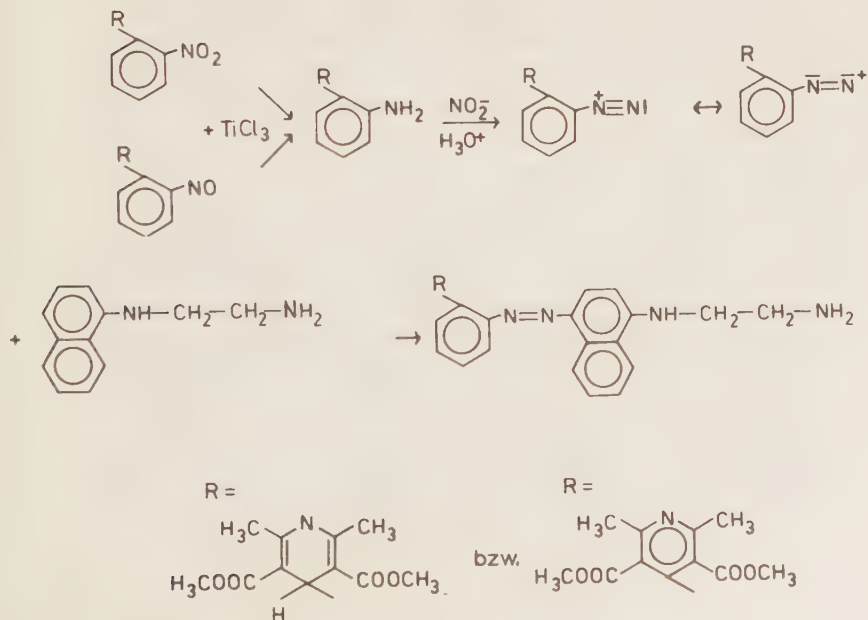
Nitrosoderivat



Nitroderivat

Schwierigkeiten waren auch bei der Auswahl eines geeigneten Fließmittelsystems zu vermuten, da die enge Strukturverwandtschaft der Nifedipinderivate ein weitgehend korrespondierendes chromatographisches Verhalten erwarten ließ. Aus einer Auswahl von 17 gängigen Fließmitteln erwies sich das System Chloroform-Cyclohexan (95 + 5) bei Verwendung von DC-Fertigplatten Kieselgel 60 als geeignet. Da die Trennung aber auch bei Verwendung dieses Laufmittels keineswegs optimal war, wurde die Ermittlung eines differenzierenden Detektionsmittels besonders wichtig.

Eine hinreichende Unterscheidungsmöglichkeit bietet die Reaktion nach BRATTON und MARSHALL (46) nach Reduktion der Nitro- bzw. Nitrosogruppe zum primären aromatischen Amin mit Hilfe von Titan (III)-chlorid, anschließender Diazotierung und Kupplung zum Azofarbstoff:



Praktische Durchführung

Arbeitsmittel

Chemikalien (analysenreine Qualitäten):

Chloroform, Cyclohexan, N,N-Dimethylformamid, Natriumnitrit, N-(1-Naphthyl)äthylendiamin (Art. 6237 Merck), Salzsäure (37 %), Titan(III)-chloridlösung (Art. 808507 Merck)

DC-Fertigplatten Kieselgel 60

Sprühvorrichtung (Desaga Spray-Gun)

Auftragekapillaren (Desaga)

Chromatographiekammern (z.B. Desaga Simultan-Trennkammer mit Knopfdeckel und Tubusdeckel mit Begasungssystem)

Ablüftvorrichtung (z.B. Heizlüfter mit Kaltstufe)

Kühlvorrichtung (z.B. Tiefkühltruhe)

Fließmittel (s.o.)

Bratton-Marshall-Reagens: 1,0 g N(1-Naphthyl)-äthylen-diamin wird in 50 ml N,N-Dimethylformamid und 50 ml 4 N-Salzsäure evtl. unter Erwärmen gelöst. Die erkaltete Lösung wird filtriert. Eine schwache violette Färbung stört die Anwendung nicht (46).

Methodik

Das Untersuchungsmaterial (z.B. Extrakt aus Mageninhalt) wird in der gewohnten Weise am Startpunkt aufgetragen, ebenso vermutete Vergleichssubstanzen. Es folgt die Entwicklung mit dem angegebenen Fließmittel, gegebenenfalls kann man auch nach den Methoden der zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie verfahren. Nach dem gründlichen Ablüften der organischen Fließmittelrückstände wird die Platte unter dem Abzug zwecks Reduktion der Nitrogruppen gleichmäßig, aber nicht bis zur Nässe mit Titan(III)-chloridlösung besprüht. An-

schließlich trocknet man das Chromatogramm im Kaltluftstrom eines Gebläses und kühlt auf etwa -20°C ab, um bei der nachfolgenden Diazotierungsreaktion einen möglichst quantitativen Umsatz zu erzielen (Platte etwa 10 min in eine Tiefkühltruhe stellen).

Es folgt die Diazotierung der primären aromatischen Amine durch Einstellen in eine Kammer, die nitrose Gase (darunter N_2O_3) enthält (Becherglas mit etwas Natriumnitritlösung in der Kammer; durch eine Öffnung im Deckel etwa 5 ml konz. Salzsäure bis zur Gasentwicklung zufließen lassen). Nach etwa 3 - 5 min wird die Dünnschichtplatte wieder aus der Begasungskammer genommen und bis zur restlosen Verflüchtigung der anhaftenden Stickoxide (Geruchsprobe; etwa 30 min) kalt abgeblasen. Anschließend wird durch Besprühen mit Bratton-Marshall-Reagens zum Farbstoff gekuppelt.

Ergebnisse:

Beim Ausschluß jeglicher Lichteinflüsse (Arbeiten in Dunkelheit) konnten folgende Trennergebnisse und Anfärbbarkeiten erzielt werden:

<u>Substanz</u>	<u>R_F-Wert</u>	<u>BRATTON-MARSHALL-Detektion</u>
Nifedipin	0,12	rotbraun
Nitro-Derivat	0,16	gelb
Nitroso-Derivat	0,27	gelb

(Fließmittel: Chloroform/Cyclohexan; 95 + 5, v/v; DC-Fertigplatten Kieselgel 60 von Merck; aufsteigende Methode, keine besondere Aktivierung; Kammersättigung).

Anmerkung: Im Hinblick auf die Zersetzlichkeit von Nifedipin wurde die Laufstrecke bewußt klein gewählt.

3.1.1.2.3. Prüfung der Lichtstabilität von Nifedipin

In umfangreichen Belichtungsversuchen konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

a) Belichtung auf der Platte (d.h. im aktivierten Zustand)

Unter normalen Beleuchtungsverhältnissen (diffuses Tageslicht, Leuchtröhren an der Raumdecke) trat bereits bei 5 bzw. 30 minütiger Exposition eine partielle Umwandlung in das Nitrosoderivat ein, die nach 5 Stunden abgeschlossen war. Nach diesem Zeitintervall konnte kein unverändertes Nifedipin mehr nachgewiesen werden. Weitgehend analoge Ergebnisse waren beim Bestrahlen mit UV-Licht von 254 bzw. 366 nm (DC-Betrachtungsgerät UVIS der Fa. Desaga) zu beobachten.

b) Belichtung als Pulverprobe auf einem Uhrglas

In einer zweiten Versuchsreihe wurde auf einem Uhrglas fein verteiltes Nifedipin mit einer Halogen-Filmleuchte (1000 Watt) während 5, 10, 20, 40, 90, 180, 360 und 720 Minuten bestrahlt. Nach der Belichtung wurden je 1 mg Substanz in der gewohnten Technik mit 300 mg Kaliumbromid zu einer Pille gepreßt und im infraroten Teil des Spektrums gemessen. In gleicher Weise wurden Nifedipin-Proben behandelt, die 6 bzw. 11 Monate dem Tageslicht (teilweiser Sonneneinfall durch die Laborfenster) ausgesetzt waren. Der Vergleich mit den IR-Spektren von Nifedipin, bzw. Nitro- und Nitrosoderivaten lieferte folgende Befunde:

Mit Hilfe der angegebenen Methode (Spektrenvergleich) erkennbar, beginnt die Umwandlung zum Nitrosoderivat

nach einigen Stunden (ca. 6 Stunden) und ist erst nach Zeiträumen in der Größenordnung von Monaten völlig abgeschlossen.

Bei einer Exposition über längere zeitliche Intervalle (bis zum Abschluß der gesamten Beobachtungsdauer von 11 Monaten) ist keine nennenswerte Weiteroxydation zum Nitroderivat zu beobachten. Eine Umwandlung zur Nitroverbindung konnte übrigens auch bei Bestrahlungsversuchen auf der DC-Platte nicht festgestellt werden.

c) Belichtung in Lösung

Nifedipin wurde in schwach salzsaurer Lösung (0,1 n, d.h. in etwa dem gastrischen Milieu entsprechend) aus 50 cm Abstand vor einem gut reflektierenden weißen Hintergrund mit einer Fotolampe (300 Watt) bestrahlt. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und UV-photometrisch gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß eine Umwandlung zum Nitroso-Derivat innerhalb der ersten Stunde praktisch quantitativ vollzogen war.

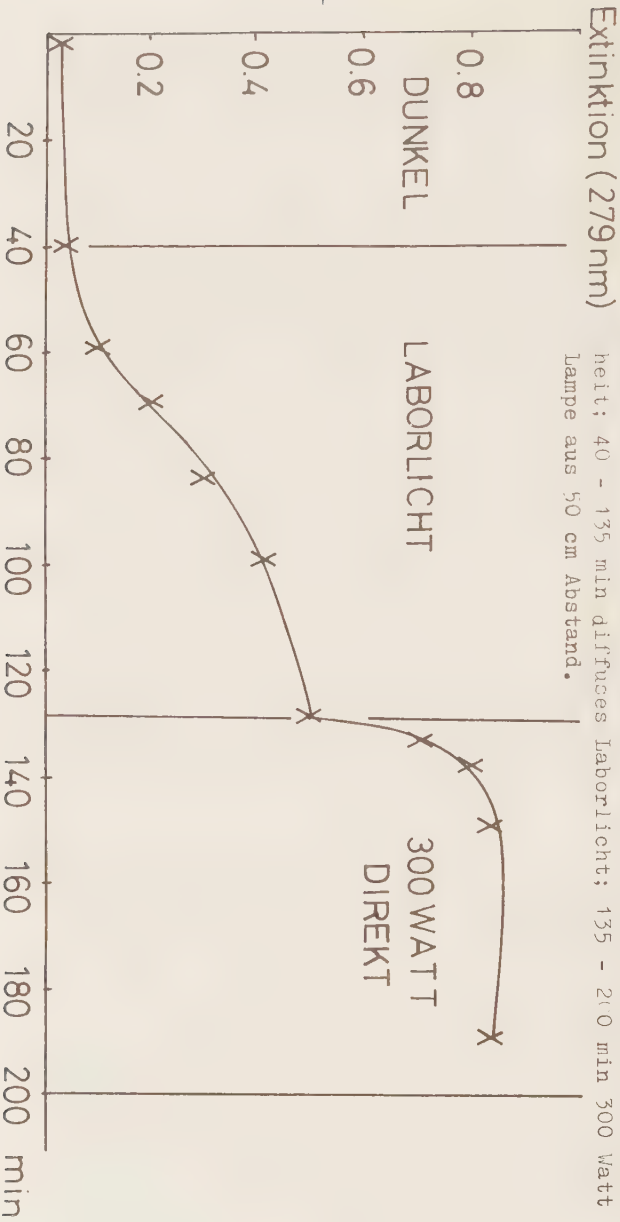
Beim Stehenlassen im diffusen Tageslicht (ebenfalls in 0,1 n Salzsäure) war eine sich über Stunden hinziehende Umwandlung zum Nitrosoderivat meßbar.

Bei längerer Lagerung in völliger Dunkelheit waren dagegen keine Umsetzungen zu beobachten.

In Abb. 1 sind typische Umwandlungskurven wiedergegeben, (nähere Einzelheiten s. Abbildungslegende auf S. 16).

Abb.1:

Zunahme an Nitrosoderivat beim Bestrahlen einer salzsauren Lösung von Nifedipin. Bestimmung durch Messung der Extinktion bei 279 nm, da in diesem Bereich eine Extinktionszunahme praktisch ausschließlich durch die Nitrosoverbindung bewirkt wird. 0 - 40 min Küvette in Dunkelheit; 40 - 135 min diffuses Laborlicht; 135 - 200 min 300 Watt Lampe aus 50 cm Abstand.



3.1.1.2.4. Gaschromatographische Untersuchungen

Gerät: VARIAN AEROGRAPH SERIES 2100 mit FID, Ofen-
temperatur 250⁰ C, ET 290⁰ C, Säulenlänge 1,5 m
(Glas), 2 mm ID, Trägergas N₂ (p = ca. 1,5 atü).

3 % OV-17 auf Chromosorb G, AW-DMCS (80/100 mesh):

Substanz	Nettoretentionszeit	Retentionsindex
Nifedipin	790 sec	3142
Nitrosoverbindung	158 sec	2586
Nitroverbindung	250 sec	2742

3 % SE-30 auf Chromosorb G, AW-DMCS (80/100 mesh):

Nifedipin	143 sec	2572
Nitrosoverbindung	48 sec	2155
Nitroverbindung	68 sec	2288

Die gaschromatographischen Untersuchungen sprechen für eine relativ gering ausgeprägte Thermolabilität des Nifedipin. Bei den oben wiedergegebenen Parametern konnte keine Zersetzung beobachtet werden. Lediglich bei Vorversuchen mit einem Temperaturprogramm (100 - 280⁰ C; Heizrate 10⁰ C min⁻¹) war eine Aufspaltung des Nifedipins in zwei Komponenten festzustellen.

Die Berechnung der Retentionsindizes in der vorliegenden Arbeit wurde nach Kováts (515), zit. nach Kaiser (516), mit Hilfe der nachstehenden Beziehung vorgenommen:

$$I_X = (I_n - I_V) \left[\log \frac{t_{msx} - t_m}{t_{msv} - t_m} : \log \frac{t_{msn} - t_m}{t_{msv} - t_m} \right] + I_V$$

wobei I_X = unbekannter Index

I_V = Index der Bezugssubstanz vor Peak X

I_n = Index der Bezugssubstanz hinter Peak X

t_{sx} = $t_{msx} - t_m$, Nettoretentionszeit der Substanz X

t_{sv} bzw. t_{sn} sind die entsprechenden Nettoretentionszeiten der Bezugssubstanzen

t_{msx} = Bruttoretentionszeit der Substanz X
(analog t_{msv} bzw. t_{msn})

t_m = Totzeit

3.1.1.2.5. Elektronenanregungsspektren

Nifedipin: In Äthanol scharfes Maximum bei 235 nm; langgezogene Absorption etwa von 325 bis 370 nm. In n/10 Salzsäure bei 270 nm, in n/10 Natronlauge bei 290 nm relativ un- deutlich ausgeprägte Extinktionsmaxima.

NO-Derivat: In Äthanol Maxima bei 280 und 310 nm, Minima bei 255 und etwa 300 nm. In n/10 Salzsäure Maxima bei 279 und 315 nm, Minima bei 246 und 300 nm. In n/10 Na- tronlauge Maxima ebenfalls bei 279 und 315 nm, Minima bei 259 nm und 300 nm.

NO₂-Derivat: In Äthanol Schulter bei etwa 260 nm. In n/10 Salzsäure Maximum bei 277 nm, Mini- mum bei 246 nm. In n/10 Natronlauge Maxi- mum bei 273 nm, Minimum bei 252 nm.

In den Spektren (vgl. Abb. 2 a - c) sind weiterhin je- weils die Holmium-Eichpeaks bei 279,4 bzw. 287,5 nm wiedergegeben.

Insbesondere aus den Abbildungen ist deutlich er- sichtlich, daß die Derivate infolge einer Vergrößerung des mesomeren Systems durch weitere Aromatisierung wesentlich differenziertere Spektren besitzen als Nifedipin mit seinem partiell hydrierten Pyridin- ring.

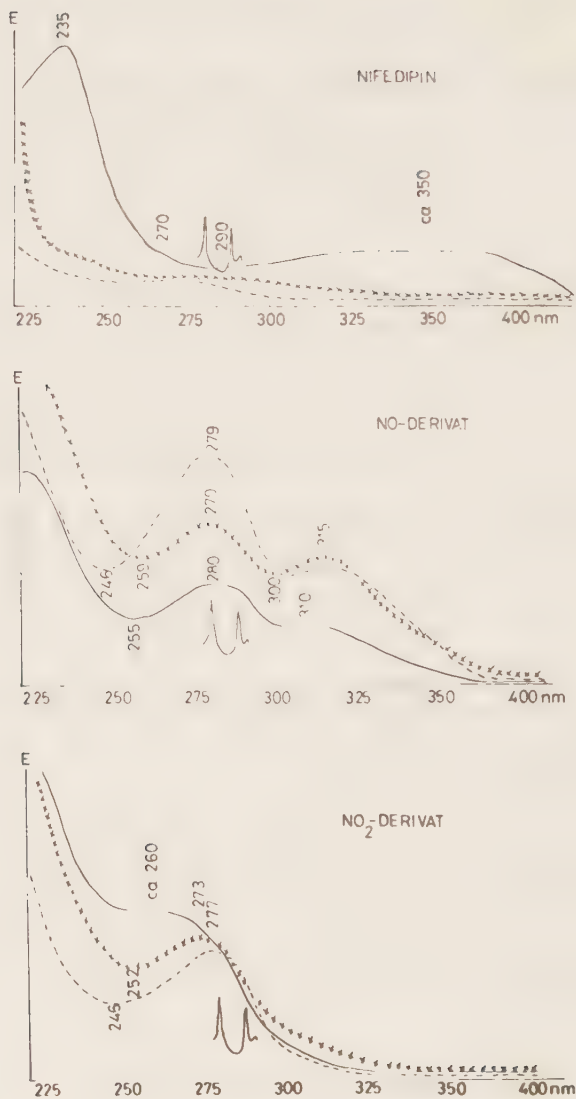


Abb.2: UV-Spektren von Nifedipin, NO-Derivat und NO₂-Derivat (gemessen in 3 Medien: — = Äthanol; ----- = n/10 HCl; xxxxxxxx = n/10 NaOH)

3.1.1.2.6. Infrarotspektren

Die Infrarotspektren sind in Abb. 3 a - c wiedergegeben. In den Spektren sind die gut ausgeprägten Absorptionen der Ar-NO_2 (bei 1370 cm^{-1} u. 1525 cm^{-1}) bzw. Ar-NO -Substituenten (bei 1495 cm^{-1}), sowie die Ester-carbonylbanden bei 1730 cm^{-1} deutlich zu erkennen.

Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen Nifedipin und den beiden Pyridinderivaten ist die bei Nifedipin auftretende und bei der NO- bzw. NO_2 -Verbindung fehlende Bande bei 3320 cm^{-1} ($-\text{NH}$ bei Nifedipin), während die bei 2950 cm^{-1} vorhandene Absorption (CH -Streckschwingung) naturgemäß in allen 3 Spektren ausgeprägt ist.

Der aromatische Charakter kommt schließlich im intensiven Bandenmuster zwischen 690 und 900 cm^{-1} zum Ausdruck, das sich unter Zuhilfenahme anderer Kriterien als o -Phenylsubstitution interpretieren läßt.

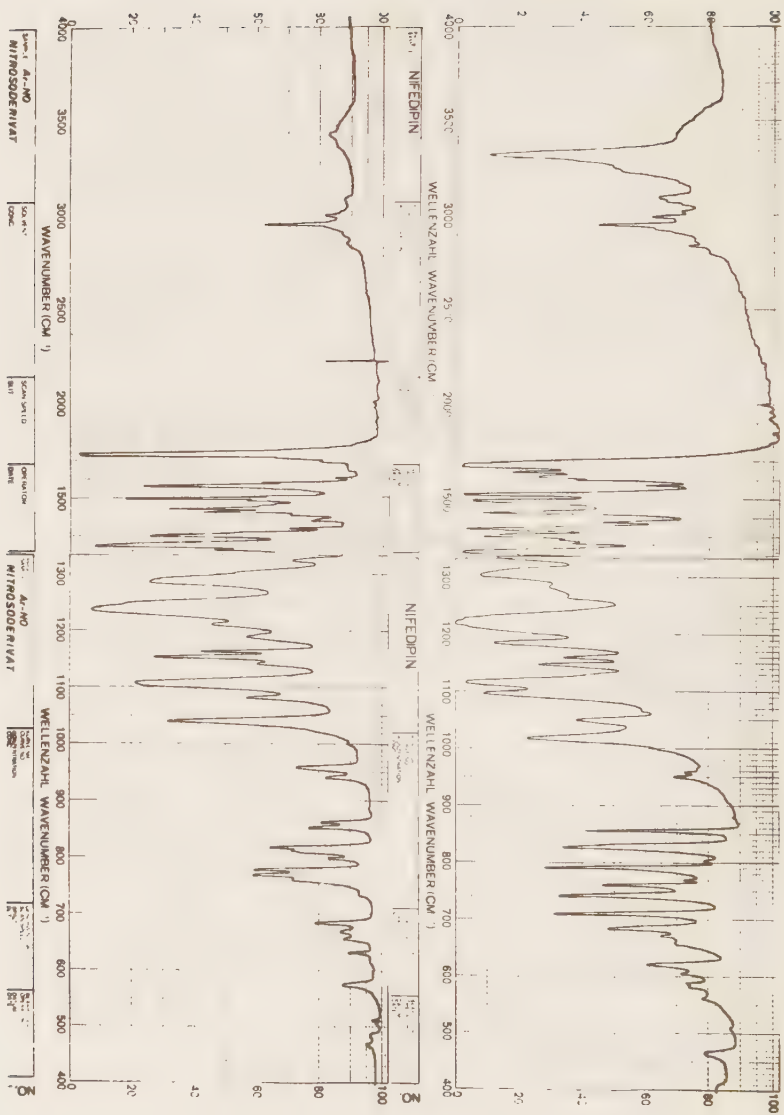


Abb.3b

Abb.3a

Abb.3: IR-Spektren von Nifedipin (Abb.3a), NO-Derivat (Abb.3b), sowie NO_2 -Derivat (Abb.3c), KBr-Preßtechnik, ca. 1mg Substanz pro 500 mg KBr.

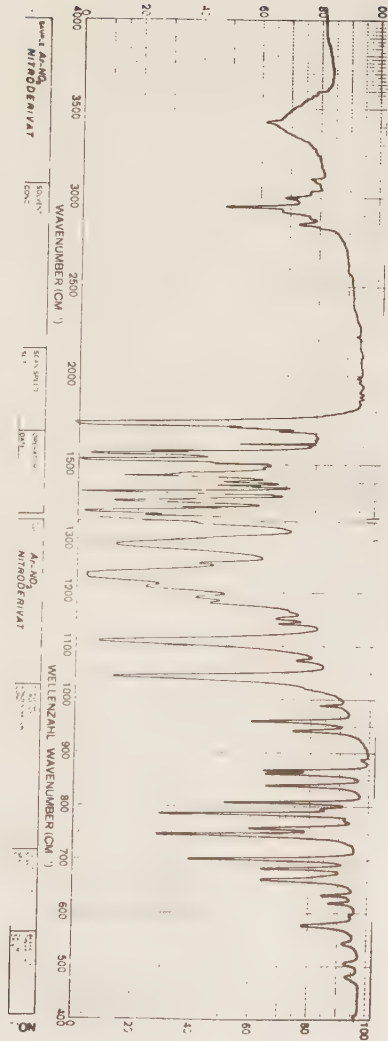


Abb.3c

3.1.1.2.7. Massenspektren

Nifedipin (vgl. Abb. 4 a):

Peakinterpretation

- $m/e = 346$: Molekularpeak
 $m/e = 329$: Basispeak (für Ester typische Abspaltung von OH),
 $m/e = 315$: Abspaltung von Methoxyl,
 $m/e = 314$: Abspaltung von CH_3OH aus Methylestern ungesättigter und zweibasiger Säuren,
 $m/e = 270$: $-\text{C}_6\text{H}_4^+$
 $m/e = 224$: Abspaltung der Nitrophenylgruppe (?)

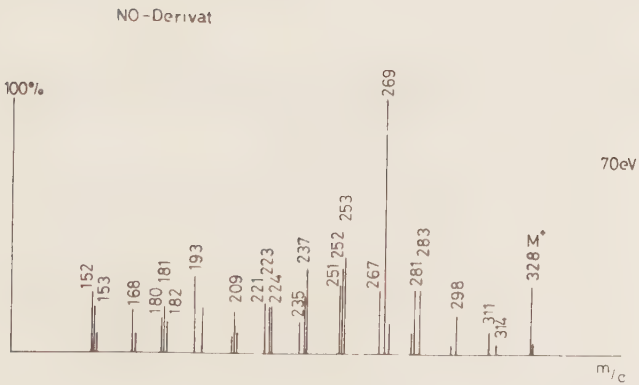
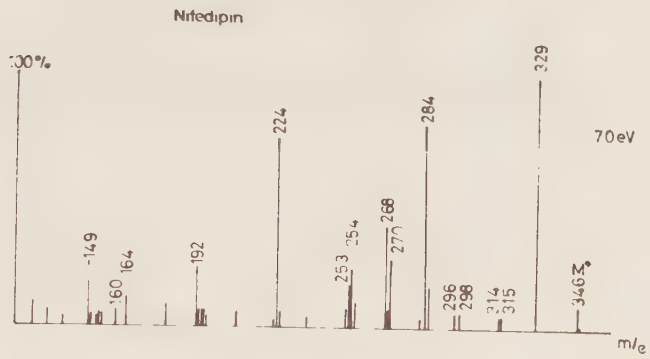
Nitroso-Derivat (vgl. Abb. 4 b):

Peakinterpretation

- $m/e = 328$: Molekularpeak
 $m/e = 311$: Abspaltung von OH
 $m/e = 298$: Abspaltung von NO
 $m/e = 296$: Abspaltung von CH_3OH aus Methylestern zweibasiger Säuren,
 $m/e = 283$: Für aromatische Ester typische Abspaltung von OH und CO,
 $m/e = 269$: Abspaltung von $-\text{COOCH}_3$ (Basispeak)
 $m/e = 253$: evtl. $-\text{C}_6\text{H}_3^+$
 $m/e = 252$: $-\text{C}_6\text{H}_4^+$ (aus Benzolderivaten)
 $m/e = 251$: $-\text{C}_6\text{H}_5^+$ (aus monosubstituierten Benzolderivaten mit einem elektronenanziehenden Substituenten).

Anmerkung: Das Massenspektrum des Nitro-Derivates ist in (44) abgebildet; auf eine nochmalige Wiedergabe wurde daher verzichtet.

Abb.4: Massenspektren von Nifedipin und NO-Derivat (70eV, Direkteinlaß).



3.1.1.3.0. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nifedipin wandelt sich beim Belichten mit sichtbarer und ultravioletter Strahlung im adsorbierten aktiven Zustand auf der Dünnschichtplatte bereits nach wenigen Minuten in das Nitrosoderivat (4-(2'-Nitrosophenyl)-2,6-dimethylpyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester) um.

Auch beim intensiven Bestrahlen mit sichtbarem Licht in schwach salzsaurer Lösung geht Nifedipin innerhalb kurzer Zeit in die Nitrosoverbindung über.

Bei einer Exponierung als Substanzpulver im nichtaktiven Zustand tritt die Umwandlung in merklichem Ausmaß erst nach einigen Stunden ein.

Eine Weiteroxydation zur Nitroverbindung (4-(2'-Nitrophenyl)-2,6-dimethylpyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester) konnte nicht festgestellt werden.

3.1.1.4.0. Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigen, daß Nifedipin insbesondere bei der dünnsschichtchromatographischen Handhabung und in Lösung leicht unter Rearomatisierung des partiell hydrierten Pyridinringes in ein Nitrosoderivat überführt wird.

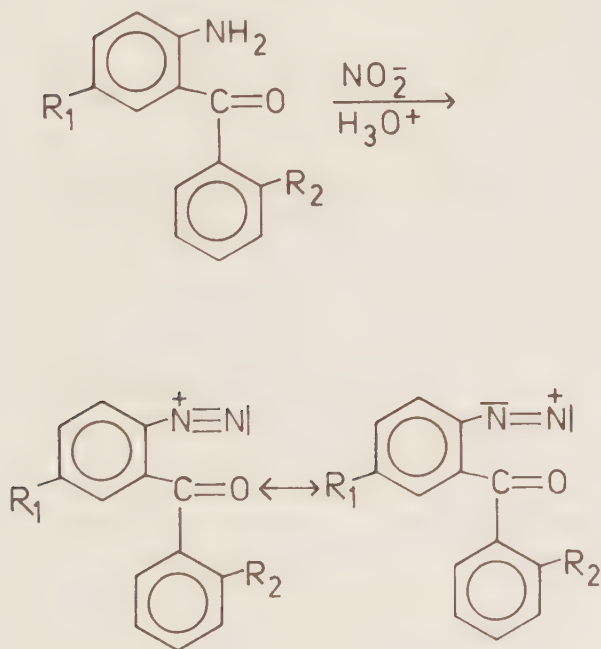
Daher ist es ratsam, dieses Derivat anhand der in dieser Arbeit mitgeteilten analytischen Daten zur zusätzlichen Charakterisierung heranzuziehen.

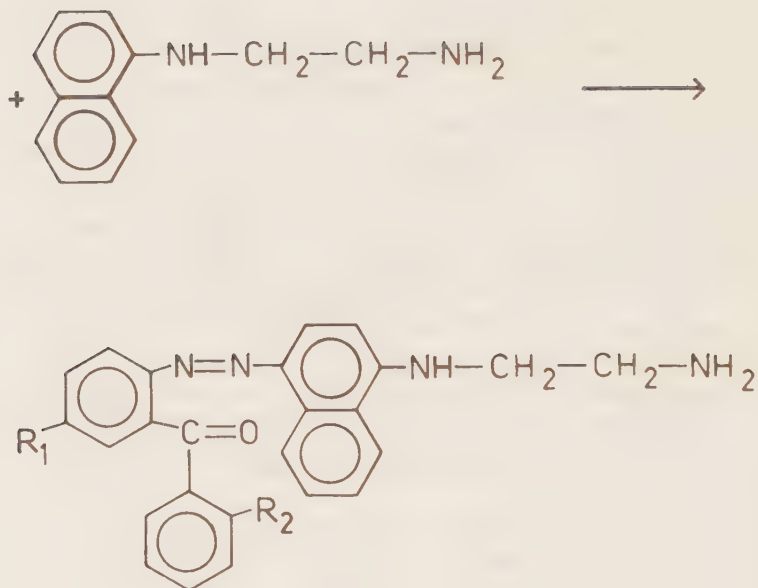
Die relativ geringe Umwandlungsgeschwindigkeit im nicht sorptiv verteilten Zustand dürfte jedoch, entgegen der ursprünglichen Vermutung einer extrem hohen Lichtempfindlichkeit, zur Konsequenz haben, daß bei der Aufarbeitung gängiger Asservate (wie z.B. Tablettenspuren, Reste in Trinkgefäßen) stets noch Anteile unveränderten Nifedipins vorhanden und identifizierbar sind.

3.1.2.0.0. Photolytische Desalkylierung N-1-alkylierter 1,4-Benzodiazepine

3.1.2.1.0. Einleitung

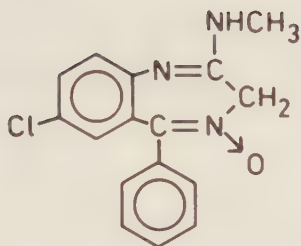
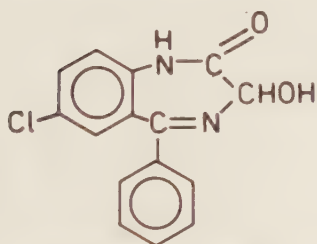
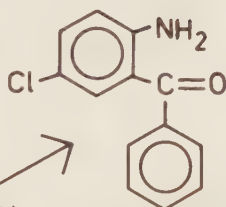
Wie bereits in Kapitel 3.1.1.2.2. ausgeführt, können primäre aromatische Amine auf der Dünnschichtplatte durch Diazotierung und Kupplung zu Azofarbstoffen (z.B. mit Bratton-Marshall Reagens) empfindlich und sehr spezifisch nachgewiesen werden. Diese Technik der Detektion ist insbesondere im Rahmen der Benzodiazepinanalytik weit verbreitet (47-66), wobei zunächst durch Hydrolyse der Ausgangsverbindungen substituierte Aminobenzophenone hergestellt werden.



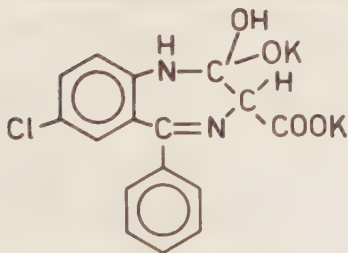
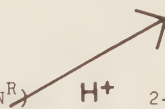


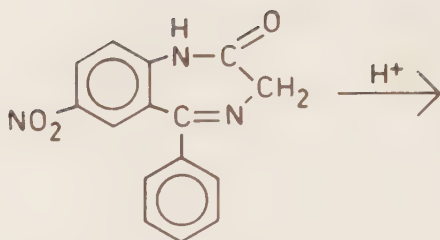
Darüber hinaus wird diese Methode jedoch auch zum Nachweis anderer Pharmaka bzw. Giftstoffe mit Erfolg eingesetzt (67-70).

Da sich primäre aromatische Amine bei der sauren Hydrolyse lediglich aus 1,4-Benzodiazepinen bilden können, die am N-1-Stickstoff keinen weiteren Substituenten tragen sondern ein Wasserstoffatom besitzen, war der Einsatz der Methode bisher auf den Teil der Benzodiazepine, deren Strukturen in der folgenden Übersicht wiedergegeben sind, beschränkt. Die folgenden Aufstellungen zeigen weiterhin die bei der sauren Hydrolyse entstehenden Aminobenzophenone.

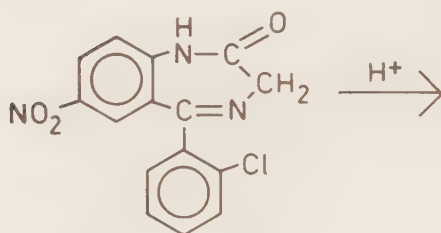
Chlordiazepoxid (LIBRIUM^R)Oxazepam (ADU: BRAN^R, PRAXITEN^R)

2-Amino-5-chlorobenzophenon

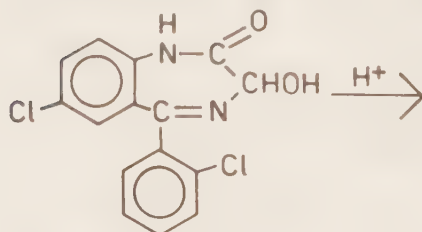
Chlorazepat (TRANXILIUM^R)

Nitrazepam (LOGADAN^R)

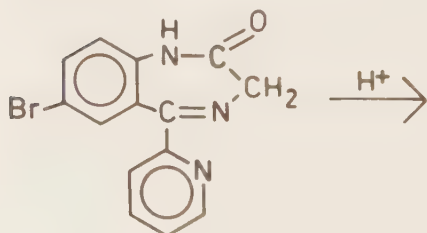
2-Amino-5-nitrobenzophenon

Clonazepam (RIVOTRIL^R)

2-Amino-5-nitro-2'-chlorbenzophenon

Lorazepam (TAVOR^R)

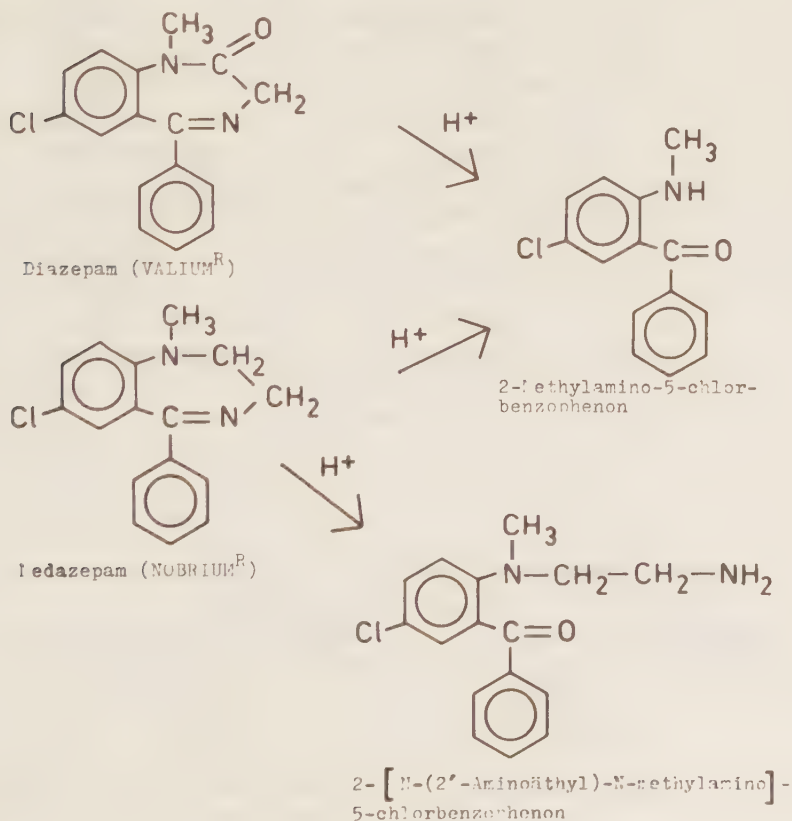
2-Amino-5,2'-dichlorbenzophenon

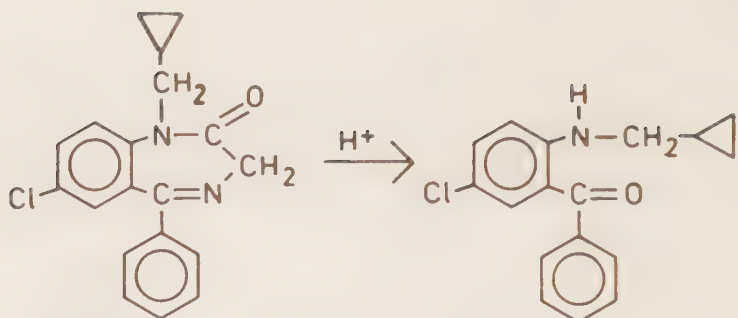
Bromazepam (LEXOTANIL^R)

2-(2-Amino-5-brombenzoyl)-pyridin

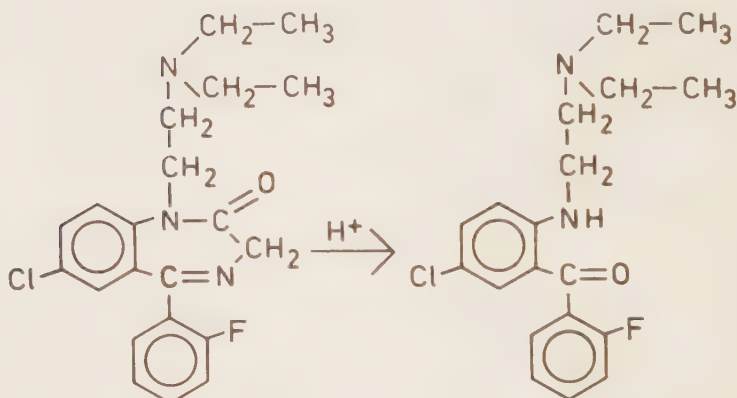
Folgende Benzodiazepine sind einer Diazotierung und Kupplung nicht zugänglich, da aus ihnen bei der sauren Hydrolyse (Einzelheiten zur Methodik s. unter praktische Durchführung) sekundäre aromatische Amine entstehen, die mit salpetriger Säure zu Nitrosaminen reagieren.

Bei der sauren Hydrolyse von Medazepam entsteht zunächst 2-[N-(2'-Aminoäthyl)-N-methylamino]-5-chlorbenzophenon, das sich bei längerer Einwirkung von Säure und Hitze weiter zu 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon desalkylieren läßt (vgl. auch (101)).

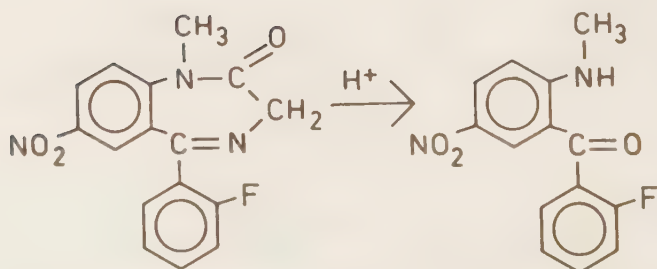


Prazepam (DEMETRIN^R)

2-Cyclopropylmethylamino-5-chlorobenzophenon

Flurazepam (DALMADORM^R)

2-Diäthylamino-äthylamino-5-chlor-2'-fluorbenzophenon



Flunitrazepam (ROHYPNOL)

2-Methylamino-5-nitro-2'-fluorbenzophenon

3.1.2.2.0. Problemstellung

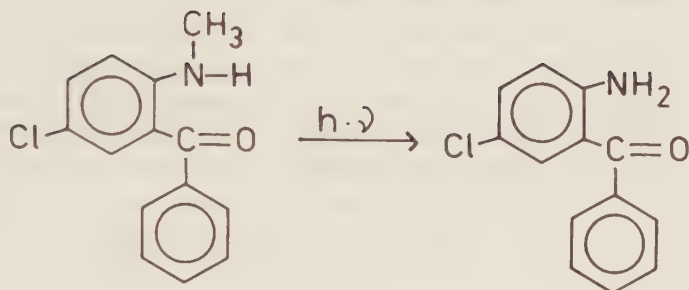
Es ist von Nachteil, daß so häufig eingesetzte Wirkstoffe wie insbesondere Diazepam (aber auch Medazepam und neuerdings Prazepam) mit Hilfe der äußerst empfindlichen Kupplungsreaktion nicht erfassbar sind. Bei der Körperpassage entsteht aus Diazepam (71-78), Medazepam (79) und Prazepam (80-82) im Zuge der Bio-transformation (nach einer Desalkylierung durch vorwiegend in den Lebermikrosomen lokalisierter Enzyme) das gemeinsame Stoffwechselprodukt Oxazepam, aus dem bei der sauren Hydrolyse 2-Amino-5-chlorbenzophenon gebildet wird, das dann ebenfalls (vgl. Übersicht) erfassbar wird. Im Hinblick auf die Tatsache, daß 2-Amino-5-chlorbenzophenon somit nach einer Einnahme von Chlordiazepoxid (86-91), Oxazepam (92-97), Chlorazepat (98-100), Diazepam (71-78), Medazepam (79) und Prazepam (80-82) im Harn nachweisbar ist, dürfte einem alleinigen Nachweis von 2-Amino-5-chlorbenzophenon allenfalls die Bedeutung eines Screening-tests auf diese sechs Benzodiazepine zukommen lassen, der selbstverständlich z.B. im Rahmen einer orientierenden Suchanalyse von großem pragmatischem Nutzen ist. Gerade bei den Benzodiazepinen mit ihren sehr unterschiedlich ausgeprägten Wirkungsprofilen erhebt sich jedoch stets die Forderung nach dem gezielten Nachweis der betreffenden Einzelverbindungen, da erst dann exaktere Stellungnahmen zu forensisch-toxikologischen Problemen möglich sind.

3.1.2.3.0. Versuche zur photolytischen Desalkylierung

Im Rahmen dieses Arbeitsgebietes ("Reaktionen auf der Dünnschichtplatte") sollten deshalb Möglichkeiten untersucht werden, ins-

besondere auch Benzodiazepine durch gezielte Derivatisierungsreaktionen in leichter nachweisbare Folgeprodukte zu überführen. Beispielsweise gelingt die Trennung des strukturchemisch eng verwandten Benzodiazepinpaares Oxazepam/Lorazepam, wenn man die Ausgangssubstanzen auf der Dünnschichtplatte durch saure Hydrolyse in die entsprechenden Aminobenzophenone überführt (21). Die sich ebenfalls lediglich durch eine Chlorsubstitution in 2'-Stellung unterscheidenden Benzodiazepine Clonazepam und Nitrazepam können jedoch auch nach einer Hydrolyse nicht über ihre Aminobenzophenonderivate getrennt bzw. unterschieden werden. Eine sichere Differenzierung zwischen beiden Tranquilizern gelingt nach Reduktion der Nitrogruppen in Position 7 des 1,4-Benzodiazepin-grundgerüsts und nachfolgender Acetylierung durch Entwickeln der Platte mit einem Acetanhydrid-haltigen Fließmittel (näheres zur Methodik vgl. (45)). Auch diese Reaktionen können in vorteilhafter Weise auf dem Sorbens der Dünnschichtplatte durchgeführt werden. Schließlich gelingt es auch, durch die Kombination verschiedener Derivatisierungsreaktionen (z.B. Reduktion und Hydrolyse) ein besonders differenziertes Muster von Derivaten auf der Platte zu erhalten (20, 100).

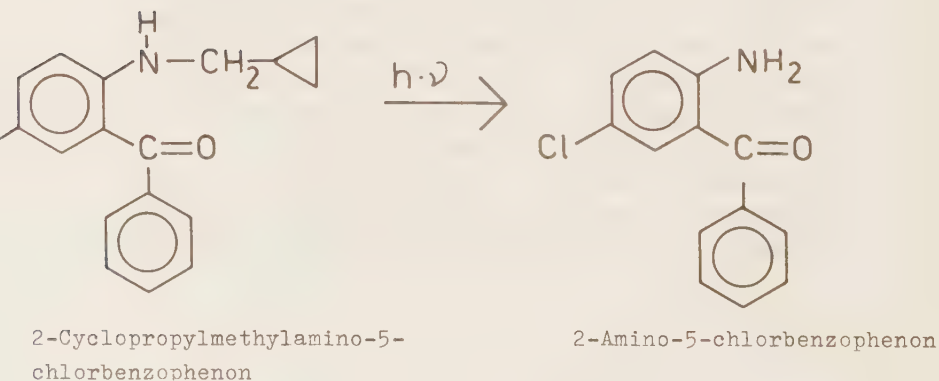
Nach einigen Vorversuchen konnte 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon durch Bestrahlung mit UV-Licht reproduzierbar in 2-Amino-5-chlorbenzophenon überführt werden.

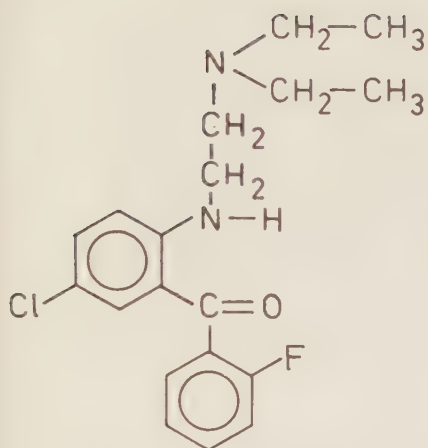


Reaktionsmechanismus und Kinetik wurden bislang nicht weiter untersucht, da die Brauchbarkeit der Methode für analytische Zwecke im Vordergrund stand.

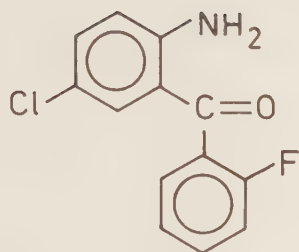
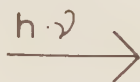
Mit Hilfe der photolytischen Desalkylierung gelingt es somit, sekundäre Aminobenzophenone in primäre umzuwandeln und auf diese Weise der Diazotierung und Kupplung zugänglich zu machen. Zwar sind auch sekundäre Aminobenzophenone beim Vorliegen größerer Mengen auf Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator anhand ihrer Fluoreszenzlöschung oder aber auch aufgrund ihrer gelben Eigenfärbung zu erkennen; diese Möglichkeit der Detektion

ist jedoch nicht sehr empfindlich und zudem auch unspezifisch, da insbesondere Extrakte aus biologischem Material (z.B. vor allem Galle) viele gelbgefärbte Komponenten enthalten, die u. U. zu Fehlinterpretationen führen können. Im Hinblick auf die mengenmäßig relativ kleinen Dosen bei der Verabreichung von Benzodiazepinen (etwa 1 - 50 mg pro Tag je nach Substanz) ist es weiterhin wichtig, daß mit Hilfe der Kupplungsreaktion nach BRATTON-MARSHALL (näheres dazu s.u.) noch 0,02 bis 0,05 µg primäres Aminobenzophenon pro Fleck nachweisbar sind, während die Erkennbarkeit der sekundären Aminobenzophenone um Größenordnungen geringer ist. Der Nachweis via Diazotierung und Kupplung ist schließlich auch um ein Vielfaches spezifischer, da der positive Ausfall an konkretere Substanzeigenschaften (prim. aromatisches Amin, Diazotierbarkeit, identische Farbe des Azofarbstoffes u.a.m.) gebunden ist. Mit Hilfe weiterer Untersuchungen konnte sichergestellt werden, daß photolytische Desalkylierungen zur entsprechenden Nor-Verbindung auch bei anderen sek. Aminophenonen stattfinden, die sich durch saure Hydrolyse (s. Methodik) aus den korrespondierenden Muttersubstanzen leicht präparieren lassen:

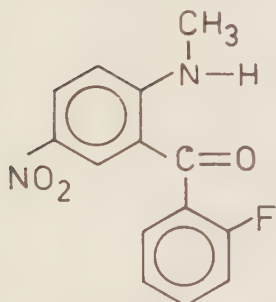




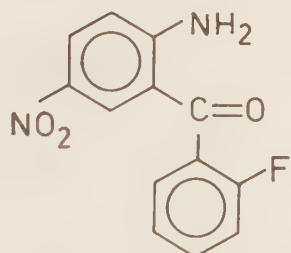
2-Diäthylamino-äthylamino-
5-chlor-2'-fluorbenzophenon



2-Amino-5-chlor-2'-fluor-
benzophenon



2-Methylamino-5-nitro-2'-
fluorbenzophenon



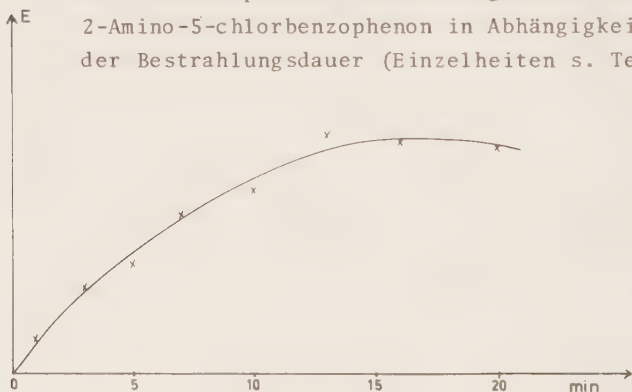
2-Amino-5-nitro-2'-fluor-
benzophenon

3.1.2.3.1. Ermittlung günstiger Belichtungszeiten

Zur Ermittlung einer optimalen Bestrahlungsdauer belichteten wir auf einer DC-Platte am Startpunkt jeweils in gleicher Menge aufgetragenes 2-Methyl-amino-5-chlorbenzophenon unterschiedlich lange mit einer Quarzlampe (Modell TQ 150 der Fa. Hanau) aus einem Abstand von 15 cm. Anschließend wurde das Chromatogramm entwickelt und in einem Scanner quantitativ ausgewertet (CAMAG Z-Scanner, Spalthöhe 13 mm, Spaltbreite 0,5 mm, 20 mm min⁻¹, 45° Optik; ZEISS PM Q II, M 4 Q III, Meßwellenlänge 510 nm).

Die Ergebnisse für die Desalkylierung von 2-Methyl-amino-5-chlor-benzophenon sind in Abb. 5 dargestellt.

Abb.5: Photolytische Desalkylierung von 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon. Darstellung der Ausbeute an 2-Amino-5-chlorbenzophenon in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (Einzelheiten s. Text)



Deutlich erkennbar ist eine optimale Belichtungsdauer von etwa 10 - 15 min. Nach dem Entwickeln der Platte konnten in allen Fällen trotz vorheriger ausreichender Belichtung noch unveränderte Anteile an sek. Aminobenzophenon festgestellt werden. Es ist möglich, auch diesen Anteil an sekundärem Amin nach der Trennung in der zweiten Laufrichtung durch nochmalige Bestrahlung zu desalkylieren und somit durch die Reaktion nach Bratton-Marshall nachzuweisen. Wir erklären dies damit, daß die photolytische Desalkylierung in erster Linie an der Oberfläche der Sorbensschicht stattfindet und bei der anschließenden Entwicklung unveränderte Substanz wieder aus tieferen Schichten an die Plattenoberfläche gelangt. Bei extrem langen Belichtungszeiten beobachteten wir Substanzverluste. Hierfür könnten weitere Fotoreaktionen oder auch oxidative Prozesse (z.B. Bildung von N-Oxiden) verantwortlich sein, da bei der UV-Bestrahlung immer mit der Bildung von Ozon gerechnet werden muß.

3.1.2.4.O. Prinzip der Nachweismethode

Durch eine Kombination von photochemischer Derivatisierungsreaktion (photolytische Desalkylierung), Diazotierung und Kupplung konnte in der praktischen Durchführungsform der TRT-Technik (1, 2) eine wesentlich verbesserte Nachweismöglichkeit für N-1-alkylierte 1,4- Benzodiazepine erarbeitet werden, deren methodische Durchführung nachstehend mitgeteilt werden soll.

Prinzip: Primäre und sekundäre Aminobenzophenone werden nach ihrer Bildung durch saure Hydrolyse und

Extraktion zunächst in der ersten Laufrichtung eines zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes vorge- trennt, danach auf der Platte mit UV-Licht behandelt, wobei aus den sekundären Aminen ansonsten struktur- analoge primäre Amine gebildet werden, die nachfolgend in der zweiten Fließrichtung getrennt sowie anschließend diazotiert und zum Azofarbstoff gekuppelt werden.

3.1.2.4.1. Praktische Durchführung

a) Arbeitsmittel

<u>Geräte</u>	DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄ von Merck 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm. Auftragekapillaren bzw. Mikropipetten Sprühvorrichtung (Spray-Gun) Chromatografierkammern (N-Kammer, Desaga) Ablüftungsvorrichtung (z.B. Heizlüfter mit Kaltstufe) UV-Lichtquelle (TQ 150, Hanau; im Notfall eignen sich auch UV-Strahlen einer Höhensonne!) heizbares Wasserbad
---------------	---

<u>Chemikalien</u>	(analysenreine Qualitäten, z.B. Merck) Ammoniak 25% Benzol Diäthyläther Dimethylformamid Natriumnitrit N-(1-Naphtyl)-äthylendiamin Salzsäure 25% Salzsäure 4 N Reinsubstanzen der Aminobenzophenone zu Referenzzwecken
--------------------	---

Lösungen

Fließmittel: Benzol

BRATTON-MARSHALL-Reagens: 1,0 g N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin wird in 50 ml Dimethylformamid und 50 ml 4 N Salzsäure evtl. unter Erwärmen gelöst. Die erkaltete Lösung wird filtriert, falls sie nicht völlig klar ist. Eine schwache violette Färbung stört die Anwendung nicht (46).

b) Methodik

Das Untersuchungsmaterial (z.B. Harn, Mageninhalt, Leberhomogenisat, Tablettenspuren) wird mit 25 %-iger Salzsäure auf einen Säuregehalt von etwa 10 - 15 % gebracht und 15 - 30 Minuten auf dem siedenden Wasserbad möglichst unter Rückflußkühlung (bei quantitativem Arbeiten unabdingbar) erhitzt. Nach der Hydrolyse wird abgekühlt, alkalisch gestellt (pH 9-11) und mit 2 x 50 ml Diäthyläther (peroxidfrei) extrahiert. Es folgt die dünnschichtchromatographische Trennung der vereinigten Auszüge in der ersten Dimension eines nach der zweidimensionalen Technik eingeteilten Dünnschichtchromatogrammes mit Benzol als Fließmittel. Nach dem sorgfältigen (!) Ablüften des Benzols wird durch Bestrahlen mit UV-Licht aus einer Entfernung von ca. 15 cm desalkyliert. Für erste Versuche empfiehlt sich eine Belichtungszeit von etwa 15 - 30 Minuten. Bei einem Routineeinsatz der Methode empfiehlt es sich, optimale Expositionzeiten entsprechend den örtlichen Gegebenheiten in Vorversuchen (prakt. Durchführung wie unter 4. beschrieben) zu ermitteln. Anschließend folgt die Trennung in der zweiten Dimension ebenfalls mit

Benzol, da in umfangreichen Untersuchungen festgestellt wurde, daß sich die zahlreichen Aminobenzophenone aus Benzodiazepinen optimal am einfachsten mit Benzol differenzieren lassen.

Zur Detektion wird das wiederum sorgfältig von Fließmittelresten befreite Chromatogramm zunächst zwecks Diazotierung in eine Kammer gestellt, die nitrose Gase enthält (Becherglas mit etwa 20%iger wäßriger Natriumnitritlösung in der Kammer; durch eine Öffnung im Deckel der Kammer mit einer Pipette 25%ige Salzsäure bis zur Nitrosegasentwicklung zufließen lassen). Hierbei erfolgt während einer Verweildauer von 3 - 5 min die Diazotierung der primären aromatischen Aminogruppen. Nach dem Herausnehmen der Platte läßt man noch anhaftende nitrose Gase unter dem Abzug völlig abdampfen (etwa 30 - 40 min). In Eilfällen genügt es aber auch, die Platte nach nur etwa 5 minütigem Ablüften schwach mit 1%iger wäßriger Harnstofflösung zur Beseitigung der bei der anschließenden Kupplung störenden nitrosen Gase zu besprühen. Die Kupplung mit BRATTON-MARSHALL-Reagens liefert rot- und bläuviolette Farbtönungen. Hierzu wird die Platte mit BRATTON-MARSHALL-Reagens gleichmäßig besprüht (Zubereitungsvorschrift s.o.). Nach unseren Erfahrungen ist es zu empfehlen, die Dünnschichtchromatogramme während längerer Lagerungszeit (1 - 5 Tage) wiederholt zu sichten, da viele Farbstoffe mehr oder weniger charakteristische Farbveränderungen erfahren, die beim Übereinstimmen mit der Referenzsubstanz den Beweiswert der Chro-

matogramme deutlich erhöhen. Weiterhin ist es sicher erwähnenswert, daß die mit BRATTON-MARSHALL-Reagens anfärbbaren Benzophenonderivate beim Besprühen mit 2n-Natronlauge von blauviolett auf kirschrot umschlagen.

3.1.2.4.2. Ergebnisse

In Abb. 6 ist ein zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm wiedergegeben, das entsprechend der oben geschilderten Verfahrensweise behandelt wurde, nachdem am Startpunkt ein Gemisch gebräuchlicher Aminobenzophenone aufgetragen war.

Weitere Einzelheiten können der Abbildungslegende entnommen werden.

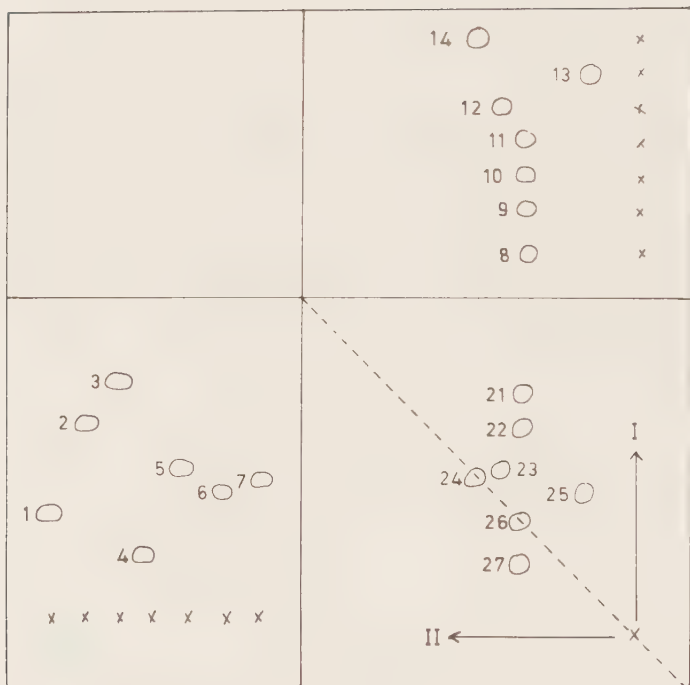


Abb.6: DC zur photolytischen Desalkylierung.
 Nähere Einzelheiten vgl. Text und
 umseitige Erläuterung zu Abb.6 (S.45)

Erläuterungen zu Abbildung 6 (auf S.44)

Subst.Nr.	Chem.Bezeichnung
in Abb.6:	und gegebenenfalls Entstehung aus:
1	2-Amino-5-chlorbenzophenon
2	2-Methylamino-5-chlorbenzophenon
3	2-Cyclopropylmethylamino-5-chlorbenzophenon
4	2- $\left[\text{N}-(2'\text{-Aminoäthyl})\text{-N-methylamino} \right]$ -5-chlorbenzophenon
5	2-Diäthylamino-äthylamino-5-chlor-2'-fluorbenzophenon
6	2-Methylamino-5-nitro-2'-fluorbenzophenon
7	2-Amino-2',5-dichlorbenzophenon
8	2-Amino-5-chlorbenzophenon durch Desalkylierung aus 2- $\left[\text{N}-(2'\text{-Aminoäthyl})\text{-N-methylamino} \right]$ -5-chlorbenzophenon
9	2-Amino-5-chlorbenzophenon durch Desalkylierung aus 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon
10	2-Amino-5-chlorbenzophenon durch Desalkylierung aus Cyclopropylmethylamino-5-chlorbenzophenon
11	2-Amino-5-chlorbenzophenon (Reinsubstanz)
12	2-Amino-5-chlor-2'-fluorbenzophenon durch Desalkylierung aus 2-Diäthylamino-äthylamino-5-chlor-2'-fluorbenzophenon
13	2-Amino-5-nitro-2'-fluorbenzophenon durch Desalkylierung aus 2-Methylamino-5-nitro-2'-fluorbenzophenon
14	2-Amino-2',5-dichlorbenzophenon (Reinsubstanz)
Hauptfeld:	
21	wie 10
22	wie 9
23	wie 12
24	wie 14
25	wie 13
26	2-Amino-5-chlorbenzophenon z.B.durch Hydrolyse aus Chlordiazepoxid, Oxazepam oder Chlorazepat
27	wie 8

3.1.2.5.0. Diskussion der Ergebnisse

- a) Bei Anwendung der mitgeteilten Methodik tritt 2-Amino-5-chlorbenzophenon nicht wie bisher an einer Stelle des Chromatogrammes auf, sondern kann grundsätzlich beim Vorliegen der entsprechenden Ausgangsverbindung an 4 verschiedenen Orten der Platte lokalisiert werden, je nachdem, ob es aus

2-Methylamino-5-chlorbenzophenon,

2-[N-(2'-Aminoäthyl)-N-methylamino]-5-chlorbenzophenon,

2-Cyclopropylmethylamino-5-chlorbenzophenon oder

bereits bei der sauren Hydrolyse z.B. aus Chlordiazepoxid, Chlorazepat oder Oxazepam

entstanden ist, d.h. im letzteren Fall nicht erst durch photolytische Desalkylierung auf der Platte gebildet wurde, sondern als 2-Amino-5-chlorbenzophenon im Extrakt vorlag. Dies findet einen äußeren Ausdruck auch im chromatographischen Verhalten, da sich bei Verwendung des gleichen Fließmittels in beiden Laufrichtungen (im vorliegenden Fall Benzol) alle Substanzen, die von der Derivatisierungsreaktion nicht erfaßt wurden, auf einer Diagonalen des Hauptfeldes (in der Abbildung gestrichelt markiert) befinden. Geringe Abweichungen von dieser Regel beruhen auf Aktivitätsänderungen des Sorbens bewirkt durch die Derivatisierungsreaktion oder andere äußere Einflüsse.

Zur exakten Differenzierung zwischen Chlordiazepoxid, Chlorazepat und Oxazepam sei auf eine bereits von uns erarbeitete Methode verwiesen (18),

bei der die ungespaltenen Benzodiazepine extrahiert, in der ersten Laufrichtung getrennt und anschließend auf der Platte hydrolysiert werden, wobei sich 2-Amino-5-chlor-benzophenon ebenfalls an verschiedenen Stellen des Chromatogrammes anfärben läßt.

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilte Variante der Hydrolyse vor der Extraktion bietet mikrochemisch entscheidende Vorteile, da sich die Aminobenzophenone wesentlich besser insbesondere aus biologischem Material isolieren lassen als die korrespondierenden Benzodiazepine.

- b) Die Methode gestattet es weiterhin, die beiden neuartigen Benzodiazepine Flurazepam und Flunitrazepam mit Hilfe der äußerst empfindlichen Reaktion nach BRATTON-MARSHALL zu erfassen.
- c) Evtl. weitere diazotier- und kuppelbare Substanzen, die anhand der Rf-Werte nicht ohne weiteres zugeordnet werden können und sich meist auch durch andere Kupplungsfarben auszeichnen (insbesondere tiefblaue Farbtönungen) sind sehr oft auf andere gebräuchliche Fremdstoffe zurückzuführen (z.B. Pyrazolonmetaboliten, Phenacetinderivate, Sulfonamide), die bei der sauren Hydrolyse gleichfalls primäre aromatische Amine bilden, bereits vor der Hydrolyse solche Strukturelemente enthielten oder bei der photolytischen Desalkylierung in primäre Amine überführt wurden.

Eine spezielle Methodik zum Nachweis dieser Verbindungen wurde von uns ebenfalls bereits entwickelt (vgl. auch Abschnitt 3.2.1.0.0.).

3.2.0.0.0. Derivatisierung durch chemische Agentien

3.2.1.0.0. Hydrolytische Spaltung

3.2.1.1.0. Allgemeine Ausführungen

Im Hinblick auf den ständig zunehmenden Medikamenten-gebrauch gerade auch bei Verkehrsteilnehmern kommt dem analytischen Nachweis eingenommener Arzneimittel bzw. deren Metaboliten eine immer wachsende Bedeutung zu. In der Roten Liste finden sich bei vielen Arzneien Hinweise auf die Gefahr der Beeinflussung der Verkehrstauglichkeit. Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang vor allem Psychopharmaka und Analgetika. Beide Gruppen stellen zudem auch noch die umsatzstärksten Arzneimittelgruppen dar. Oft fehlen jegliche Angaben der Betroffenen zur Art der eingenommenen Präparate, so daß insbesondere zunächst sogenannte "screening-Methoden" erforderlich sind, die ein möglichst breites Spektrum verkehrsmedizinisch relevanter Wirkstoffgruppen umfassen. Die herangezogenen Verfahren müssen darüber hinaus sehr empfindlich sein, da in vielen Fällen nur wenige ml Untersuchungsmaterial (z.B. Restblutprobe nach der Blutalkoholbestimmung) zur Verfügung stehen. Die genannten Anforderungen sind weiterhin im Rahmen der Notfallanalytik zu erfüllen, da auch bei Vergiftungen oft kaum Anhaltspunkte für die Art der eingenommenen Stoffe vorliegen. Außerdem spielt bei suicidalen und akzidentiellen Intoxikationen der Zeitbedarf einer Methode eine große Rolle, so daß Verfahren mit hohem zeitlichem Aufwand (hierzu kann auch die langwierige Inbetriebnahme einer komplizierten Analysenapparatur bei Eilfällen z.B. während der Nachtstunden gehören) oft ausscheiden müssen.

Ein schnell und einfach durchzuführendes Nachweisverfahren sollte so angelegt sein, daß zunächst die Verbindungsklasse erkannt wird, während erst in einem zweiten Schritt die eindeutige Identifizierung erfolgt. Die Methodik hat deshalb zunächst auf den Nachweis charakteristischer Schlüsselfragmente hinzuzielen.

Einen festen Platz im Instrumentarium der "screening-tests" haben die insbesondere von Geldmacher- v. Mallinckrodt (106, 107, 140) kritisch untersuchten Tüpfelproben. Weiterhin dürften die UV-Spektroskopie sowie die Dünnschichtchromatographie (letztere verbunden mit einer systematischen Auswahl der Fließmittel und Anfärbereagentien (vgl. auch Vidic u. Klug (108)) als Methoden anzusehen sein, die bei vertretbarem Aufwand viele Einzelinformationen liefern. Nicht unerwähnt sollte jedoch bleiben, daß die mit Hilfe von "screening-tests" erhaltenen Ergebnisse in den meisten Fällen einer Absicherung und Bestätigung durch andere Methoden (z.B. IR und MS) bedürfen (vgl. hierzu insbesondere Bäumler u. Brandenberger (109)).

Auffallend viele Arzneisubstanzen enthalten im Molekülverband basische Aminogruppen. Bei der Biotransformation treten dabei häufig Entalkylierungsreaktionen auf. War das basische Zentrum im genuineen Arzneimittel an ein aromatisches System gebunden, so sind in zahlreichen Fällen primäre aromatische Amine, deren Acetyllderivate oder andere Konjugationsprodukte die am leichtesten nachzuweisenden Endprodukte der Biotransformation. Durch saure Hydrolyse entstehen aus den verschiedenen Ausscheidungsprodukten jeweils die entsprechenden Amine; hierdurch ergeben sich Vereinfachungen beim Nachweis der eingenommenen Arzneimittel.

Nachfolgend wird eine Methode beschrieben, die im Rahmen der in wohl allen chemisch-toxikologischen Untersuchungsstellen angewandten dünnschichtchromatographischen Routineprüfung auf Benzodiazepine mit Hilfe der Reaktion nach Bratton u. Marshall (46) wertvolle Hinweise auch auf die Einnahme zahlreicher wichtiger nichtbenzodiazepinartiger Wirkstoffe liefert. Angeregt zu den vorliegenden Untersuchungen wurden wir durch die häufige Beobachtung, daß neben den größtenteils bekannten Hydrolyseprodukten der Benzodiazepine oft noch andere Aminkomponenten renal ausgeschieden wurden, die bei der Anfärbung nach Bratton u. Marshall (46) ebenfalls positiv mit mehr oder weniger ausgeprägten und differenzierten Kupplungsfarben reagierten. Hauptsächlich bedingt durch korrespondierende Angaben zur Einnahme bestimmter, immer wiederkehrender Wirkstoffe, lenkte sich bald der Verdacht auf einzelne Pharmaka. Zahlreiche Selbstversuche und zusätzliche spektroskopische Untersuchungen wurden zur Absicherung der Ergebnisse herangezogen.

3.2.1.2.0. Untersuchte Wirkstoffe

3.2.1.2.1. Benzodiazepine

Nachstehend sind die aus den gegenwärtig gebräuchlichsten Benzodiazepinverbindungen bei der sauren Hydrolyse der ursprünglichen Arzneisubstanz oder der Metaboliten entstehenden Benzophenonderivate aufgeführt. Auf eine nochmalige Wiedergabe der in Kapitel 3.1.2.1.0. bereits abgebildeten Strukturformeln wurde an dieser Stelle verzichtet. Sind die aufge-

führten Aminobenzophenonderivate durch Hydrolyse von Metaboliten entstanden, so ist dies durch die Angabe (Met.) hinter dem entsprechenden Freinamen angezeigt. Diese Aufstellung zeigt, daß nur bei einer einzigen Substanzklasse bereits mit einer ganzen Reihe verschiedenartiger doch sehr ähnlich gebauter primärer aromatischer Amine zu rechnen ist. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die angeführten Aminobenzophenone in unterschiedlichen Mengen im Harn auftreten. Dies hängt davon ab, ob es sich um Hydrolyseprodukte der Hauptmetaboliten handelt oder nicht. Soweit hierzu allgemeine Angaben gemacht werden können, sind diese in der Übersicht ebenfalls enthalten.

Übersicht über die bei der Hydrolyse von Benzodiazepin-derivaten oder deren Metaboliten entstehenden Aminobenzophenonderivate:

Lfd. Nr.:	Benzophenon- derivat	entstanden durch Hydrolyse aus:	Bemerkungen
1	2-Amino-5-nitro- benzophenon	Nitrazepam	meist nur in Spuren nach- weisbar
2	2-Amino-2'-fluor- 5-nitrobenzo- phenon	Flunitrazepam Met.	Nachweis nicht gesichert
3	2-Amino-2'-chlor- 5-nitrobenzo- phenon	Clonazepam	meist nur in Spuren nach- weisbar
4	2,5-Diaminobenzo- phenon	Nitrazepam Met.	Hydrolyse- produkt des Hauptmetaboliten
5	2,5-Diamino-2'- fluorbenzophenon	Flunitrazepam Met.	Nachweis nicht gesichert
6	2,5-Diamino-2'- chlorbenzophenon	Clonazepam Met.	Hydrolyse- produkt des Hauptmetaboliten
7	2-Amino-5-chlor- benzophenon	Oxazepam Diazepam Met. Chlordiazepoxid Chlorazepat Medazepam Met. Prazepam Met.	
8	2-Amino-2',5-di- chlorbenzophenon	Lorazepam	
9	2-(2-Amino-5-brom- benzoyl)-pyridin	Bromazepam	

Bei einigen Benzodiazepinderivaten entstehen bei der Hydrolyse N-Alkylaminobenzophenonderivate. Diese sind als sekundäre aromatische Amine nicht diazotierbar, d.h. sie reagieren nicht nach Ansprüchen mit Bratton-Marshall-Reagens zu tief gefärbten Azofarbstoffen. Bei der Behandlung mit nitrosen Gasen entstehen aus diesen Substanzen die entsprechenden Nitrosamine, die durch ihre Gelbfärbung auf den Chromatogrammen erkennbar sind.

Lfd. Nr.:	Benzophenon- derivat	entstanden durch Hydrolyse aus:	Bemerkungen
10	2-Methylamino- 5-nitro-2'-fluor- benzophenon	Flunitrazepam	meist nur in Spuren nach- weisbar
11	2-Methylamino- 5-chlor-benzo- phenon	Diazepam	in Spuren
12	2-Cyclopropyl- methylamino- 5-chlor-benzo- phenon	Prazepam	
13	2-Diäthylamino- äthylamino- 5-chlor-2'-fluor- benzophenon	Flurazepam	in Spuren

Strukturformeln hierzu in Kap. 3.1.2.1.0.

3.2.1.2.2. p-Aminophenolderivate

3.2.1.2.3. Pyrazolonderivate

Primäre aromatische Amine entstehen bei der Bio-transformation auch anderer Arzneimittel. Einige wichtige Substanzen sind nachstehend wiedergegeben. Auffallend ist hierbei, daß die angeführten Verbindungen charakteristisch für eine ganze Arzneimittelgruppe sind.

Lfd.Nr.:	prim.aromatisches Amin	entstanden durch Hydrolyse oder Biotransformation
14	p-Phenetidin	Acetophenetidin Lactylphenetidin Bucetin Salicylphenetidin
15	p-Aminophenol	Acetaminophen (sowie in geringerer Konzentration oftmals auch aus den Subst. 1fd.Nr.14)
16	Sulfanilsäureamid	Sulfonamide
17	Sulfanilsäure	Sulfonamide
18	1-Phenyl-2,3-di- methyl-4-amino- pyrazolon-(5) (="4-Aminoantipyrin")	Amidopyrin Metamizol Melaminsulfon Isopropylaminophenazon u.a.

Zur Absicherung und Interpretation der Ergebnisse
 - soweit an der entsprechenden Nachweisreaktion
 auch Metaboliten beteiligt sind oder sein können -
 wurde außer den bekannten Übersichtsarbeiten (110,
 111) die nachstehend aufgeführten Originalarbeiten
 über Biotransformation, Pharmakokinetik o.ä. mit
 herangezogen:

Substanz	Handelsname	Literatur
Bromazepam	Lexotanil ^R	112, 113, 114, 276, 298,
Chlorazepate	Tranxilium ^R	50, 98, 99, 115, 237, 528,
Chlordiazepoxid	Librium ^R	58, 85, 86, 87, 89, 90, 245, 246, 256, 259, 260, 267, 277, 278, 281, 292, 295, 297, 302, 303, 304, 305, 307,
Clonazepam	Rivotril ^R	116,
Diazepam	Valium ^R	71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 230, 231, 232, 236, 238, 239, 240, 241, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 255, 263, 265, 268, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 278, 279, 280, 282, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 292, 293, 294, 296, 297, 300, 308, 310, 313, 314,

Flunitrazepam	Rohypnol	82, 83, 84,
Flurazepam	Dalmadorm ^R	101, 102, 103, 104, 105 264, 306,
Lorazepam	Tavor ^R	92, 117, 139, 257, 261, 262, 269,
Medazepam	Nobrium ^R	79, 301,
Nitrazepam	Mogadan ^R	59, 60, 62, 118, 119, 204, 251,
Oxazepam	Adumbran ^R	91, 92, 93, 94, 95, 96,
	Praxiten ^R	232, 233, 234, 235, 258, 263, 266, 278, 283, 284, 290, 291, 299,
Prazepam	Demetrin ^R	80, 81, 242, 243, 244, 309, 311, 312,
Acetophenetidin	Phenacetin	120, 121, 122, 123, 124, (in vielen 125, 126, 127, 128, 145, Kombinations146, 147, 148, 149, 150, präparaten) 151, 152, 153, 154, 155, 158, 160,

Lactylphenetidin	in Kombinations- präparaten (z.B. Quadronal, Spalt)	
Bucetin	in Kombinations- präparaten (z.B. Doppelspalt, Ring- tabletten, Vivimed)	
Salicylphenetidin	(Saliphen, Pyracetin)	
Acetaminophen	Paracetamol (z.B. Benuron ^R) in vielen Kombinations- präparaten	126, 144, 158, 159,
Amidopyrin	Aminophenazon (Pyramidon ^R) in vielen Kombi- nationspräparaten	19, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 142, 143, 156, 157,
Isopropylamino- phenazon	Isopyrin ^R , Tomanol ^R	529
Melaminsulfon	(Melubrin ^R)	132
Metamizol	Novalgin ^R	132
Sulfonamide	z.B. Sulfanilamid, Sulfacetamid, Sulfadiazin, Sulfadiazin, Sulfathiourea, Sulfaguanidin, Sulfapyridin, Sulfadiazin, usw. vgl. Aufstellung in (165).	

3.2.1.3.0. Methodik

Für die Durchführung der Hydrolyse bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten an:

a) Hydrolyse auf der Dünnschichtplatte.

Hierzu werden die Wirkstoffe unzersetzt z.B. bei pH 11 mit Essigsäureäthylester extrahiert, am Startpunkt der DC-Platte aufgetragen und anschließend durch Besprühen mit konz. Salzsäure und Erhitzen bei 105⁰ C hydrolytisch gespalten, wobei die entsprechenden Aminoverbindungen entstehen. Diese Variante liefert besonders reine Extrakte, im Gegensatz zu der nachstehend beschriebenen Hydrolysenmethodik, bei der auch viele physiologische Harninhaltsstoffe nach der Hydrolyse mitextrahiert werden.

b) Hydrolyse in Lösung.

Diese Methodik empfiehlt sich beim Vorliegen extrem kleiner Probenmengen oder bei sehr niedrigen Wirkstoffkonzentrationen, da insbesondere bei den Benzodiazepinen das ungespaltene Molekül polarer als die entsprechende Aminobenzophenonverbindung ist und letztere daher mit organischen Lösungsmitteln meist in besseren Ausbeuten extrahiert werden kann.

Bei dieser Variante wird folgendermaßen vorgegangen:

Ein aliquoter Anteil Untersuchungsmaterial (z.B. Harn) wird mit dem gleichen Volumen 25 %iger Salzsäure versetzt und etwa 30 Minuten auf dem siedenden Wasserbad möglichst unter Rückflußkühlung erhitzt. Nach Geldmacher-von Mallinckrodt (53, 106, 107) genügt bereits eine Hydrolysedauer von 15 Minuten für die Spaltung der Benzodiazepinderivate. Diese Ergebnisse konnten wir bestätigen. Die von uns vorgeschlagene längere Einwirkungszeit im sauren Milieu berücksichtigt die langsamere Spaltung anderer Verbindungen (z.B. Phenacetinmetaboliten).

Nach der Hydrolyse wird abgekühlt und auf pH 8,5 gestellt. Bei der sich anschließenden Extraktion mit etwa dem gleichen Volumen Chloroform/i-Propanol (4+1) können neben der Phenolbase p-Aminophenol praktisch alle anderen Aminkomponenten in befriedigender Ausbeute isoliert werden. Lediglich bei kleinen Proben ist eine weitere Ausschüttelung bei pH 10 - 11 mit Essigsäureäthylester empfehlenswert, da hierbei noch Reste extrahiert werden, die u.U. für den sicheren Nachweis von Bedeutung sein können.

Die vereinigten Auszüge werden am Startpunkt eines nach Abb. 7 eingeteilten zweidimensionalen Dünnschichtchromatogrammes aufgetragen und in der ersten Laufrichtung mit Benzol entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte erfolgt der zweite Lauf mit Benzol / i - Propanol / Ammoniak (80 + 20 + 1); (v/v/v). Zur Detektion wird das wiederum sorgfältig von Fließmittelresten befreite Chromatogramm zunächst zwecks Diazotierung in eine Kammer gestellt, die Nitrosegase enthält (Becherglas mit etwa 20 %iger wäßriger

Natriumnitritlösung in der Kammer; durch eine Öffnung im Deckel der Kammer mit einer Pipette 25 %ige Salzsäure bis zur Entwicklung orange-brauner Nitrosegase zufließen lassen; Abzug !). Die Diazotierung ist nach etwa 3 - 5 min beendet und die Platte wird dann aus der Kammer genommen und unter dem Abzug etwa 30 - 40 min gründlich abgelüftet. Zur Zerstörung der evtl. noch anhaftenden nitrosen Gase kann man auch mit einer 1 %igen wäßrigen Lösung von Harnstoff besprühen. Die Kupplung mit Bratton-Marshall-Reagens (46) liefert die in der nachfolgenden Tabelle näher bezeichneten Farbtönungen (vgl. Tabelle auf S. 63).

Zur weiteren Behandlung der Chromatogramme vgl. auch Kap. 5.1.2.4.1. sowie 5.1.1.2.2. .

5.2.1.4.0. Ergebnisse

In Abb. 7 ist ein zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm wiedergegeben, das nach der oben geschilderten Verfahrensweise behandelt wurde, nachdem am Startpunkt ein Gemisch der in den Tabellen aufgeführten wichtigsten Verbindungen aufgetragen war.

Nähere Einzelheiten können der Abbildungslegende entnommen werden.

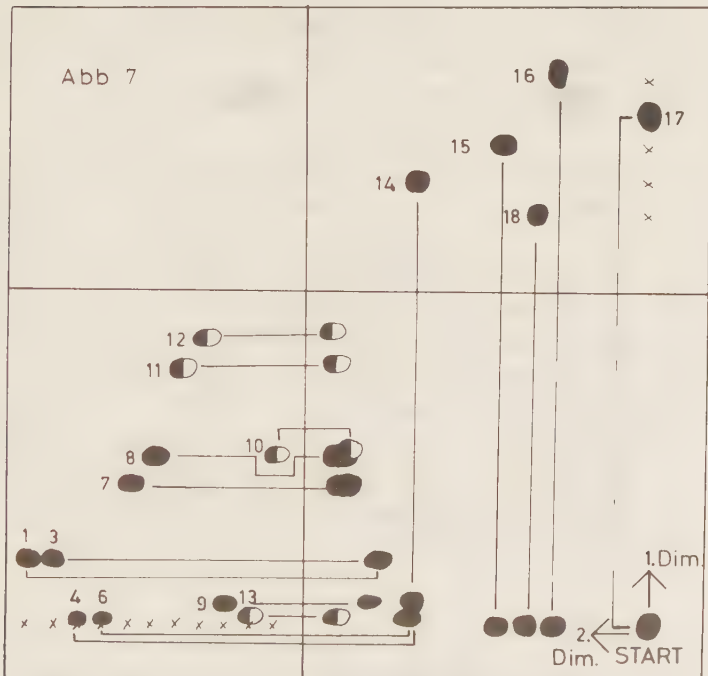


Abb.7: Dünnschichtchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte (nähere Einzelheiten s. Text und Erläuterung zu Abb.7 auf S. 62)

Erläuterungen zu Abbildung 7

Wiedergabe der Ergebnisse nach zweidimensionaler dünnschichtchromatographischer Trennung auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (20 x 20 cm, aufsteigende Methode, ohne besondere Aktivierung, keine Kammersättigung) mit Benzol in der ersten und Benzol/ iso-Propanol/ NH_3 (25%) (80+20+ 1; v/v/v) in der zweiten Laufrichtung. Die Ziffern im Chromatogramm bezeichnen die in den vorhergehenden Aufstellungen (vgl. Kap. 3.2.1.2.2. bis 3.2.1.2.3.) mit "lfd.Nr." gekennzeichneten Substanzen in analoger Weise.

Zeichenerklärung:

 = prim.Amine bzw.  = sek.Amine

Zur Möglichkeit einer Desalkylierung der sekundären Aminobenzophenone vgl. Kap. 3.1.2.O.O.

Im Hinblick auf eine erhöhte Übersichtlichkeit in der Abbildung wurden korrespondierende Substanzflecke durch Hilfslinien verbunden. Diese Darstellungsweise erscheint aber lediglich mit Rücksicht auf die n i c h t f a r b i g e Wiedergabemöglichkeit erforderlich. Tatsächlich sind die Azofarbstoffe insbesondere auch bei den eng zusammenliegenden Substanzen deutlich verschieden ausgeprägt.

R_f -Werte und Anfärbemöglichkeiten der dc-getrennten aromatischen Amine mit BRATTON-MARSHALL-Reagens.

Lfd.Nr.	R_f -Wert Benzol	R_f -Wert	Reaktion mit
		Benzol	80 BRATTON-MARSHALL-
		i-Propanol 25% NH_3	20 Reagens 1
1	0,17	0,79	rotviolett
2	0,17	0,79	rotviolett
4	0,02	0,70	violett
6	0,02	0,70	violett
7	0,34	0,87	blauviolett
8	0,46	0,87	blauviolett
9	0,06	0,81	blauviolett
10	0,50	0,91	1)
11	0,76	0,91	1)
12	0,85	0,92	1)
13	0,02	0,90	1)
14	0,08	0,69	dunkelblau
15	0,00	0,42	blauschwarz ²⁾
16	0,00	0,26	rotviolett
17	0,00	0,00	rotviolett
18	0,00	0,33	dunkelblau

1) gelb (Nitrosamine !), nach längerer Einwirkung
Farbreaktion mit BRATTON-MARSHALL-Reagens,

2) oftmals mit blauvioletter Hof.

3.2.1.5.0. Diskussion der Ergebnisse

Wie Abb. 7 entnommen werden kann, bereitet die dünn-schichtchromatographische Trennung der untersuchten Substanzen lediglich bei strukturell sehr eng verwandten Verbindungen Schwierigkeiten. So gelingt etwa die Differenzierung des Benzodiazepinpaars Clonazepam / Nitrazepam, das sich lediglich in einer Chlor-substitution in 2'-Position bei Clonazepam unterscheidet, erst mit Hilfe einer etwas aufwendigeren Derivatisierungstechnik (Ebel u. Schütz (45), vgl. auch Kap. 3.2.2.0.0.). Die ebenfalls eng verwandten Benzodiazepine Lorazepam und Oxazepam können dagegen durch dünn-schichtchromatographische Trennung ihrer bei der sauren Hydrolyse entstandenen Benzophenonderivate unterschieden werden, wenn man als Fließmittel Benzol benutzt (21). Ist die Unterscheidung dieser beiden Benzodiazepine nicht unbedingt erforderlich, so wäre es im Hinblick auf die Toxizität von Benzol insbesondere beim Routine-einsatz der Methode empfehlenswert, anstatt Benzol das von Bäumler (47) empfohlene Fließmittelgemisch Toluol / Aceton (95 + 5; v/v) einzusetzen, das allerdings zwischen 2-Amino-5-chlorbenzophenon und 2-Amino-2',5-dichlorbenzophenon nicht differenziert.

Die in der schwarz-weißen Wiedergabe der Abb. 7 leider nur unvollkommen dargestellten Resultate der Untersuchungen (tatsächlich unterscheiden sich die meisten Azoverbindungen durch charakteristisch ausgebildete Farbnuancen) zeigen dennoch die Brauchbarkeit der mitgeteilten Methode, die es gestattet, im Rahmen der Routineprüfung auf Benzodiazepine

wertvolle Rückschlüsse auf die Einnahme zahlreicher nichtbenzodiazepinartiger (aber deshalb nicht weniger wichtiger) Wirkstoffe zu ziehen. Die von der Methode zusätzlich erfaßten Wirkstoffe (Phenacetin, Paracetamol, Pyrazolone, Sulfonamide u.a.) sind darüber hinaus in zahlreichen Kombinationspräparaten enthalten, so daß ihr Nachweis fast immer auch einen Verdacht auf andere, in zusammengesetzten Zubereitungen enthaltene Wirkstoffe (z.B. Barbiturate, Codein, Mandelsäurebenzylester, Salicylate, Bromoureide, Chinin, Spasmolytika u.a.) begründet.

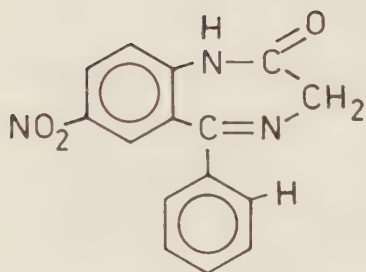
3.2.2.0.0. Reduktion und Acetylierung, dargestellt am Beispiel der Trennung von Clonazepam und Nitrazepam

3.2.2.1.0. Einleitung

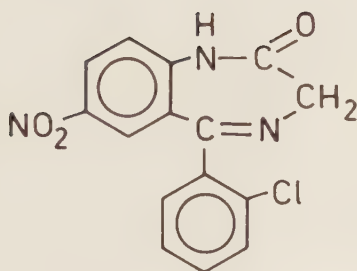
Im April 1976 wurde in der Bundesrepublik Deutschland ein neues Antikonvulsivum eingeführt, bei dem es sich um 5-(o-Chlorphenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Generic-name: Clonazepam/ Handelspräparat: RIVOTRIL^R; Hersteller: Fa. Hoffmann - La Roche & Co. AG, Basel (Schweiz)) handelt. Im Hinblick auf die günstigen pharmakologischen Eigenschaften fand diese Spezialität bereits eine verbreitete Anwendung, so daß sich die Frage des Nachweises bald nach der Neuerscheinung stellte.

Bezüglich weiterer Einzelheiten vgl. (161).

Den nachstehend abgebildeten Strukturformeln ist zu entnehmen, daß eine enge strukturchemische Verwandtschaft zu 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Nitrazepam; MOGADAN^R) besteht:



Nitrazepam



Clonazepam

Es waren daher auch ohne praktische Versuche Schwierigkeiten bei der Trennung zu vermuten. Bereits bei Untersuchungen zur dünnschichtchromatographischen Differenzierbarkeit der beiden Benzodiazepine Lorazepam (TAVOR^R) und Oxazepam (ADUMBRAN^R, PRAXITEN^R), die sich ebenfalls lediglich durch Chlorsubstitution in o-Phenylstellung (bei Lorazepam) unterscheiden, konnte festgestellt werden, daß eine dünnschichtchromatographische Trennung der unveränderten Benzodiazepine selbst bei Anwendung zahlreicher gebräuchlicher Fließmittelsysteme nicht gelingt (21, 101). Eine Unterscheidung des Benzodiazepinpaars Lorazepam/Oxazepam kann dagegen relativ einfach getroffen werden, wenn man vor der dünnschichtchromatographischen Trennung entweder in Lösung oder auf der DC-Platte sauer hydrolysiert und die hierbei gebildeten Benzophenonderivate (2-Amino-2',5-dichlorbenzophenon

aus Lorazepam bzw. 2-Amino-5-chlorbenzophenon aus Oxazepam) mit Benzol auf Kieselgel 60 entwickelt; (nähere Einzelheiten zur Methodik vgl. (21)).

Eine analoge Anwendung dieser Derivatisierungstechnik auf die Trennung des Benzodiazepinpaars Clonazepam / Nitrazepam erbrachte nicht den erhofften Erfolg. Nach zahlreichen Versuchen erwies sich eine Unterscheidung über die dünn-schichtchromatographische Trennung der 7-Acetamino-Verbindungen als besonders effektiv. Diese Derivate lassen sich auf der Dünnschichtplatte aus den Ausgangssubstanzen relativ einfach und in eleganter analytischer Technik mit Hilfe der erstmals von STAHL (1, 2) beschriebenen TRT-Methode (Trennung-Reaktion-Trennung) sowie der von uns weiterentwickelten Reaktionschromatographie (Ebel u. Schütz; noch unveröffentlichte Ergebnisse) darstellen. Nähere Einzelheiten zur Methodik s. Kap. 3.2.2.7.3.

Im vorliegenden Abschnitt soll weiterhin über Möglichkeiten der präparativen Darstellung wichtiger Metaboliten des Clonazepam berichtet werden, da diesen angesichts der ausgeprägten Biotransformation von Clonazepam und Nitrazepam besondere Bedeutung beizumessen ist. Außerdem werden analytische Daten der bei der sauren Hydrolyse entstehenden Benzophenonderivate mitgeteilt, weil diese Spaltprodukte allgemein in der Benzodiazepinanalytik eine besondere Rolle spielen, da ein Nachweis über sie meist bequemer, oft aber weniger spezifisch ist.

Die Wiedergabe einiger wichtiger Spektren erschien

vertretbar, da sich auf spektroskopischem Gebiet die Geräteausstattungen auch kleinerer Untersuchungsstellen in den letzten Jahren verbessert haben und diese Methoden daher einen größeren Interessentenkreis erfassen. In diesem Zusammenhang sei insbesondere auf die kürzlich erschienene Übersichtsarbeit von Bäumler u. Brandenberger (109) hingewiesen, die vor allem auch die Kombination der einzelnen Methoden äußerst praxisnah beschreibt. Besondere Bedeutung ist der von den genannten Autoren geschilderten Auffangtechnik gaschromatographischer Fraktionen beizumessen, da bereits mit nur 1 Mikrogramm Kondensat brauchbare Spektren (IR und MS) zu erhalten sind.

3.2.2.2.0. Literaturübersicht

Analytische Daten über Nitrazepam befinden sich in zahlreichen Handbüchern und Übersichtsarbeiten (z.B. (51, 106, 111, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 198, 202, 203, 206, 209), während die Clonazepam-Analytik naturgemäß lediglich in wenigen Neuerscheinungen berücksichtigt ist (z.B. (111, 165, 170, 195, 207, 211, 219, 223, 224, 225).

Die Bedeutung und Verbreitung des Hypnotikums Nitrazepam machen es verständlich, daß nahezu alle gängigen analytischen Methoden zum Nachweis eingesetzt wurden. So sind in der eingesehenen Originalliteratur folgende Verfahren beschrieben:

Titration	(191)
Kolorimetrie	(171, 196, 197, 201, 221, 227)
DC (Literaturauswahl)	(45, 61, 166, 172, 173, 190, 217)
TRT-Technik	(18, 20, 45, 65)
In situ Remissionsmessung	(174)
GLC (Literaturauswahl)	(175, 176, 177, 200, 204, 205, 210, 218, 222)
Fluorimetrie	(172, 178, 179)
Massenspektroskopie	(45, 176)
Polarographie	(83, 189, 207, 214, 215, 216)
NMR-Spektroskopie	(194, 213)
Enthalpiemetrische Messung	(208)
Hochdruckflüssigkeits- chromatographie	(228, 229)

Insbesondere befassen sich zahlreiche Arbeiten mit der Unterscheidung des Nitrazepam von anderen Benzodiazepinen bzw. anderen Arzneistoffen sowie mit dem Nachweis aus biologischem Material (z.B. 47, 59, 60, 63, 101, 118, 180, 181, 182, 183, 184, 193). Auch sind Angaben zur Biotransformation von Nitrazepam (50, 51, 60, 62, 110, 111, 119, 167, 180, 192, 199, 220) und Clonazepam (111, 116) sowie Berichte über Untersuchungen zur Pharmakologie und Toxikologie (Nitrazepam: (167, 185); Clonazepam: (186, 226)) und zur Pharmakokinetik (Nitrazepam: (60, 119, 167); Clonazepam: (82, 212)) im eingesehenen Schrifttum reichlich enthalten.

3.2.2.3.O. Biotransformation von Clonazepam und Nitrazepam

In Abb. 8 (s. S. 73) sind Biotransformationswege für Clonazepam ($R = Cl$) und Nitrazepam ($R = H$) sowie für bei der sauren Hydrolyse entstehende Benzophenonderivate (Substanzen 5 und 6) dargestellt. Aufgrund der Untersuchungen von Eschenhof (116) ist davon auszugehen, daß 7-Amino-clonazepam (2) Hauptmetabolit ist, während das 3-Hydroxy-7-acetamino-derivat (9) lediglich in sehr geringen Konzentrationen auftritt. Daneben werden 7-Acetamino-clonazepam (3) sowie 3-Hydroxy-7-amino-clonazepam (4) in mittleren Mengen renal ausgeschieden. In den Konjugat-Fractionen konnten 7-Aminoclonazepam (2) und ein 7-Amino-phenol-derivat (8) identifiziert werden. Quantitative Harnuntersuchungen ergaben folgendes Verteilungsmuster für die radioaktiv markierten Derivate nach oraler Verabreichung:

- 1 - 2 % unverändertes Clonazepam,
- 40 - 50 % freie Metaboliten,
- ca. 30 % Konjugate,
- 20 - 30 % nicht extrahierbare, nicht konjugierte Derivate.

Nach Eschenhof (116) wird der höchste Gehalt im Blutplasma des Menschen bei oraler Verabreichung von Clonazepam nach etwa 3 Stunden erreicht. Die Konzentrationsmittelwerte des unveränderten Pharmakons im Plasma über die Versuchszeit 1 - 72 Stunden betrugen nach einer Gabe von 1,5 mg Clonazepam bei i.v. Applikation 5,0 bis 7,8 ng/ml, bei p.o. Ver-

abreichung 3,7 bis 5,9 ng/ml. Die Absorptionsquote bei p.o. Medikation wurde zu 71,5 bis 76 % der Dosis bestimmt. Die Halbwertszeiten der Elimination des unveränderten Pharmakons betrugen nach Gaben von 1,5 mg Clonazepam i.v. 30,5 bis 40,3 Stunden, 1,5 mg Clonazepam p.o. 26,5 bis 49,2 Stunden und 9,0 mg Clonazepam p.o. 26,8 bis 32,5 Stunden. Von der p.o. applizierten Dosis von 1,5 mg Clonazepam wurden in den ersten 7 Tagen 49,4 bis 50,2 % im Urin und 9,1 bis 26,6 % im Kot ausgeschieden. Die Gesamtexkretion während der Versuchszeit belief sich auf 58,5 bis 76,3 der applizierten Dosis. Nach p.o. Verabreichung von 9,0 mg Clonazepam betrug die Ausscheidung in den ersten 10 Tagen 52,9 bis 68,8 % im Urin und während der ersten 4 Tage 13,5 bis 30,6 % in den Faeces. Die Halbwertszeiten der renalen Exkretion von Clonazepam wurden bei p.o. Gabe von 1,5 mg Clonazepam zu 33,1, 38,5 und 54,2 Stunden, bei 9,0 mg Clonazepam p.o. zu 23,0, 28,4, 34,0 und 50,7 Stunden bestimmt.

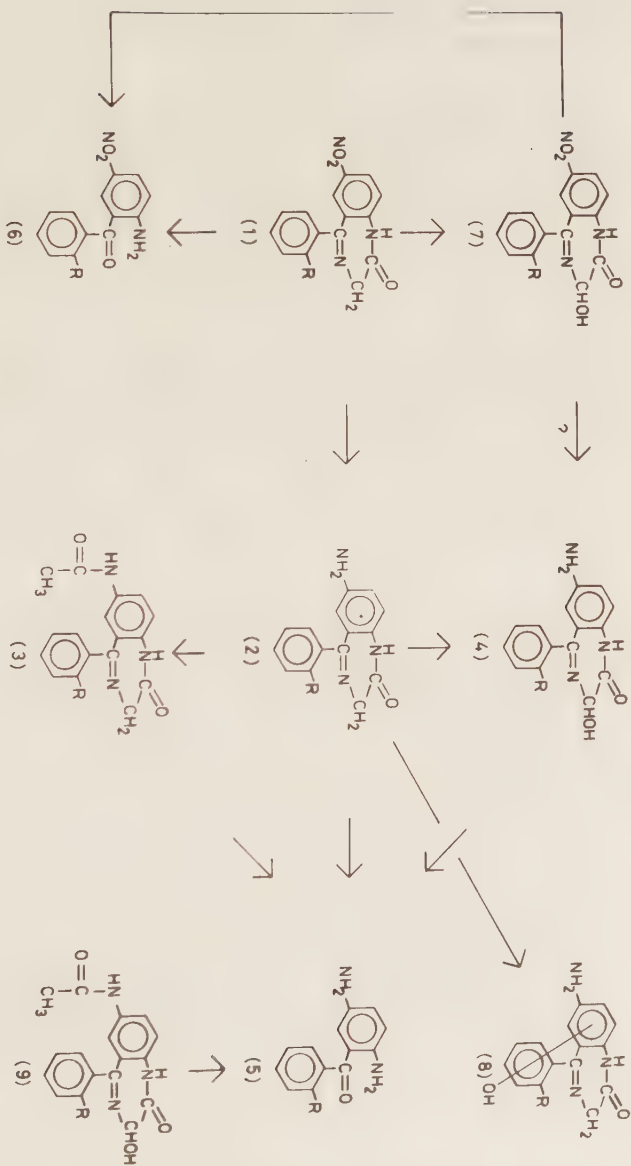


Abb. 8: Biotransformationsschema von Nitrazepam (R= H) und Clonazepam (R= Cl); nähere Einzelheiten s. Text.

Nach Beyer u. Sadée (118) und Rieder (60) sind die in Abb. 8 dargestellten Hauptmetabolisierungsschritte auch für Nitrazepam gültig.

Im Hinblick auf den äußerst geringen Anteil einiger Nebenmetaboliten am Gesamtbiotransformationsgeschehen wurden die nachfolgend beschriebenen analytischen Untersuchungen auf die wichtigsten Stoffwechsel- bzw. Hydrolysenprodukte (7-Amino-, 7-Acetamido- bzw. 7-Amino-3-hydroxy-derivate) sowie die unveränderten Ausgangsverbindungen beschränkt. Letztere treten zwar nach Körperpassage (wenn überhaupt) nur in geringen Konzentrationen auf, sind aber in anderen Asservaten (z.B. Mageninhalt, Spuren, Tablettenmaterial) meist alleinige Inhaltsstoffe.

3.2.2.4.0. Präparation wichtiger Metaboliten des Clonazepam

Clonazepam (RIVOTRIL^R) (= 5-(o-Chlorphenyl)-1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) dient als Ausgangsprodukt für die nachfolgend beschriebenen Synthesen und kann aus handelsüblichen Clonazepam-Zubereitungen durch Extraktion gewonnen werden (Fp 238-241⁰ C; evtl. aus Äthanol umkristallisieren). MG = 315,70.

7-Amino-clonazepam (= 7-Amino-5-(o-chlorphenyl)-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on): Eine Lösung von 50 mg Clonazepam in 3 ml 50%igen Äthanol wird durch Zugabe von 100 mg MgO alkalisiert und zur Reduktion mit 200 mg Na₂S₂O₄ verseift. Die Suspension

wird kräftig gerührt und etwa 1h auf dem Wasserbad (50°C) erwärmt. Nach dem Abkühlen erfolgt zunächst die Abtrennung der Hauptmenge an Lösungsmittel durch Destillieren im Vakuumrotationsverdampfer. Die verbliebene wäßrige Phase wird mit Methylenchlorid/Essigsäureäthylester (2+1) ausgeschüttelt. Anschließend engt man den abgetrennten organischen Extrakt ebenfalls im Rotationsverdampfer ein und kristallisiert aus Äthanol um (gelbe Kristalle; Fp $230 - 232^{\circ}\text{C}$). MG = 285,74.

Bemerkung: Bei unseren präparativen Versuchen überbrachte sich meist ein Umkristallisieren. Dünnschichtchromatographische Kontrolluntersuchungen in Verbindung mit der hochempfindlichen Reaktion nach BRATTON-MARSHALL sprachen für das Vorliegen eines praktisch einheitlichen 7-Amino-clonazepam-Präparates.

7-Acetamido-clonazepam (= 7-Acetamido-5-(o-chlor-phenyl)-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on): Eine Lösung von 30 mg 7-Amino-clonazepam in 0,5 g Essigsäureanhydrid wird etwa 5 Minuten auf $50 - 60^{\circ}\text{C}$ erwärmt und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach 1 h wird das Reaktionsprodukt abfiltriert und mit Diäthyläther ausgewaschen. Umkristallisieren aus Xylol/DMF (9+1) ergibt farblose Kristalle (Fp $292 - 300^{\circ}\text{C}$). MG = 327,77.

Bemerkung: Auch bei diesem Syntheseschritt erhielten wir ohne weiteres Umkristallisieren praktisch ein dünn-schichtchromatographisch einheitliches Derivat.

2-Amino-2'-chlor-5-nitrobenzophenon: Eine Lösung von 0,1 g Clonazepam in 3 ml heißem Methanol wird nach Zusatz von 5 ml 2 N HCl etwa 24 h unter Rückfluß auf dem Wasserbad (90° C) erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgt eine Abtrennung durch Filtrieren und Umkristallisieren aus Äthanol (Fp 118 - 120° C). MG = 276,7.

2,5-Diamino-2'-chlorbenzophenon: VARIANTE A: Eine Lösung von 100 mg 2-Amino-2'-chlor-5-nitrobenzophenon in 5 ml Methanol wird mit Palladium-Kohle katalytisch hydriert. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus Benzol gereinigt (Fp 30 - 40° C). MG = 246,69. VARIANTE B: 20 mg 7-Amino-clonazepam werden in 2 ml Methanol gelöst, mit 2 ml 2 N HCl versetzt und auf dem Wasserbad (90° C) etwa 12 h im Rückfluß erwärmt. Nach Extraktion aus alkalischer Lösung (pH 11) mit Essigsäureäthylester erfolgt Umkristallisieren aus Benzol.

Anmerkung: Wegen der Empfindlichkeit und Instabilität der p-Phenylendiaminstruktur (vgl. auch Ausführungen hierzu in Kap. 3.2.2.7.0.) empfiehlt es sich, die Substanz als Hydrochlorid zu handhaben.

Für die Präparation der Clonazepamderivate wurden die für analoge Verbindungen des Nitrazepam von Sawada u. Shinohara (61) angegebenen Synthesemöglichkeiten nachgearbeitet und modifiziert. Präparationsvorschriften wurden auch von Beyer u. Sadée (180) beschrieben (für Nitrazepam und einige Metabiten). Eine Präparation von 7-Amino-3-hydroxy-clonazepam (= 7-Amino-5-(o-chlorphenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) für

chromatographische Vergleichszwecke wurde im Hinblick auf die mehrstufige Synthese (Oxydation von Clonazepam zum N-Oxid mit m-Chlorperbenzoesäure, Acetylierung in 3-Stellung mit Acetanhydrid, Reduktion der Nitrogruppe mit Raney-Nickel, Umsetzung mit NaOH zur 3-Hydroxyverbindung) zurückgestellt. Wir danken der Fa. Hoffmann - La Roche ganz besonders für die Überlassung dieses Metaboliten (Ro 20 - 2771).
 Fp 340° C Zers. MG = 301,74.

3.2.2.5.0. Spektroskopische Daten von Clonazepam und Nitrazepam sowie einigen Hauptmetaboliten und Hydrolyse-derivaten

3.2.2.5.1. UV-Spektren

UV-Spektren der wichtigsten Derivate von Clonazepam und Nitrazepam sowie der Ausgangsverbindungen sind in Abb. 9 (s.S. 78) wiedergegeben. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden die Konzentrationen etwas variiert, sie sind also keinesfalls der spezifischen Extinktion proportional. Gemessen wurde in drei Medien (—— = abs. Äthanol) ----- = n/10 HCl; xxxxx = n/10 NaOH). In den Spektren sind weiterhin die beiden Holmium-Eichpeaks (279,4 bzw. 287,5 nm) wiedergegeben.

Im Hinblick auf die Vielfalt der UV-Spektren tricyclischer Verbindungen wurden die teilweise nur schwach ausgeprägten Maxima bzw. Minima in Abb. 9 b zusätzlich numerisch dargestellt.

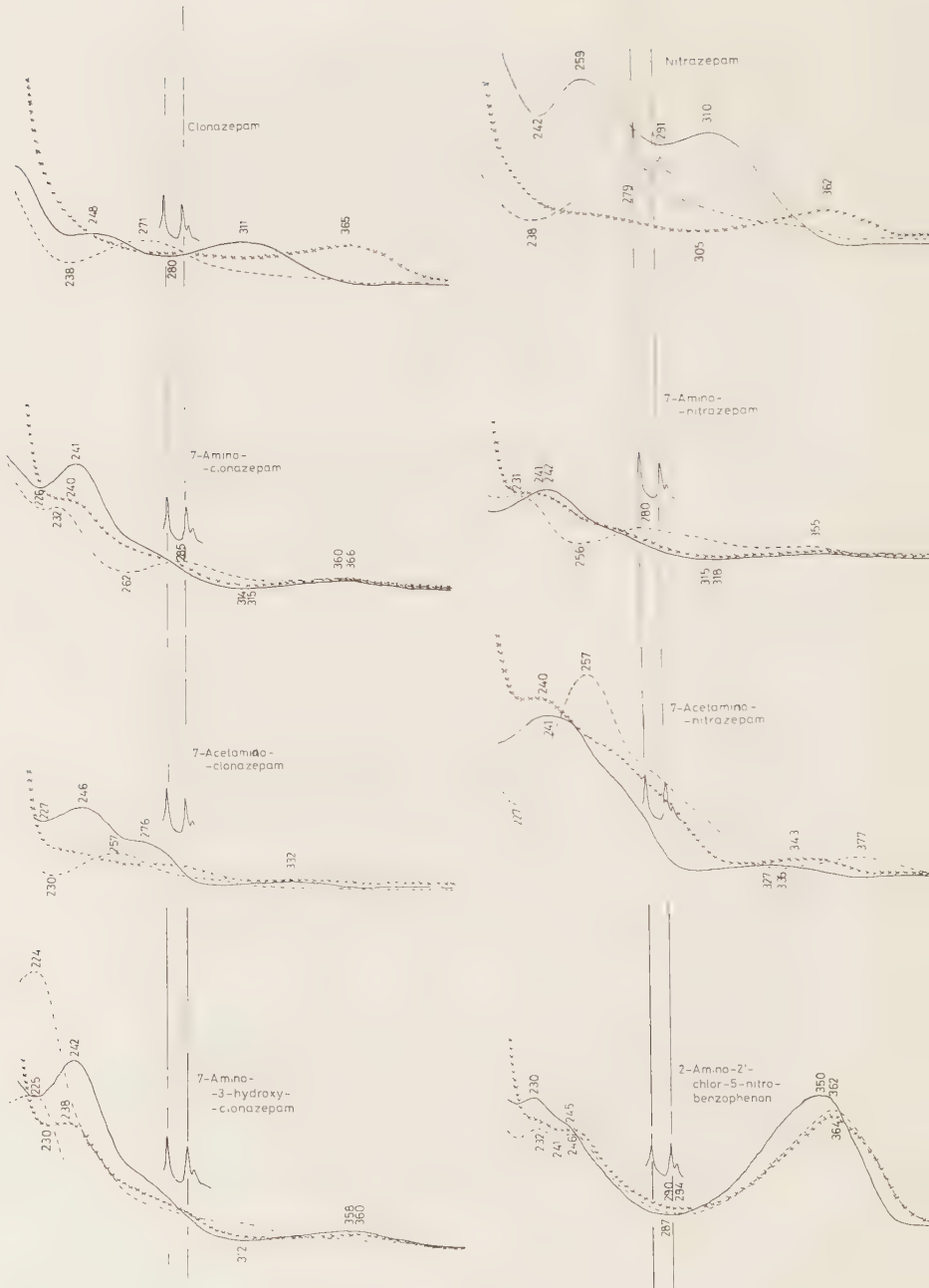
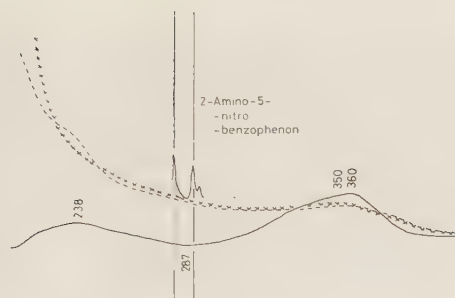
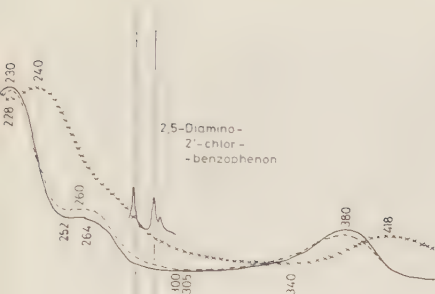


Abb.9: UV-Spektren der in Kap. 3.2.2.0.0. näher bezeichneten Substanzen



Substanz	Äthanol (nm)	n/10 HCl (nm)	n/10 NaOH (nm)
Clonazepam	<u>248 (max)</u>	238 (min)	365 (max)
	280 (min)	<u>271 (max)</u>	-----
	<u>311 (max)</u>	-----	-----
7-Amino- clonazepam	226 (min)	226 (min)	240 (Sch) ⁺
	<u>241 (max)</u>	<u>232 (max)</u>	315 (min)
	314 (min)	262 (min)	366 (max)
	360 (max)	285 (max)	-----
7-Acetamido- clonazepam	227 (min)	230 (min)	keine bes.
	<u>246 (max)</u>	<u>257 (max)</u>	Maxima od.
	276 (Sch) ⁺	-----	Minima
	332 (max)	-----	
Nitrazepam	242 (min)	238 (min)	305 (min)
	<u>259 (max)</u>	<u>279 (max)</u>	<u>362 (max)</u>
	291 (min)	-----	-----
	310 (max)	-----	-----
7-Amino- nitrazepam	<u>242 (max)</u>	<u>231 (max)</u>	241 (Sch) ⁺
	315 (min)	256 (min)	318 (min)
	355 (max)	280 (max)	-----
7-Acetamido- nitrazepam	<u>241 (max)</u>	227 (min)	240 (Sch) ⁺
	327 (min)	<u>257 (max)</u>	343 (max)
	-----	335 (min)	-----
	-----	377 (max)	-----

2-Amino-2'-chlor-	230 (max)	232 (max)	245 (max)
5-nitro-	287 (min)	241 (min)	294 (min)
benzophenon	<u>350 (max)</u>	246 (max)	364 (max)
	-----	290 (min)	-----
	-----	<u>362 (max)</u>	-----
2-Amino-5-nitro-	238 (max)	360 (max)	350 (max)
benzophenon	287 (min)	-----	-----
	<u>360 (max)</u>	-----	-----
7-Amino-3-	225 (min)	224 (max)	230 (min)
hydroxy-	<u>242 (max)</u>	-----	<u>238 (max)</u>
clonazepam	312 (min)	-----	360 (max)
	358 (max)	-----	-----
2,5-Diamino-	<u>230 (max)</u>	<u>230 (max)</u>	228 (min)
2'-chlor-	264 (Sch) ⁺⁾	252 (min)	<u>240 (max)</u>
benzophenon	300 (min)	260 (max)	340 (min)
	380 (max)	305 (min)	418 (max)
	-----	380 (max)	-----

+)

(Sch) = Schulter

Hauptmaxima sind unterstrichen, Eichung mit Holmium,

Abb. 9b : Tabellarische Darstellung der UV-Spektren
 (Abbildungen der Spektren befinden sich
 auf S. 78 - 79).

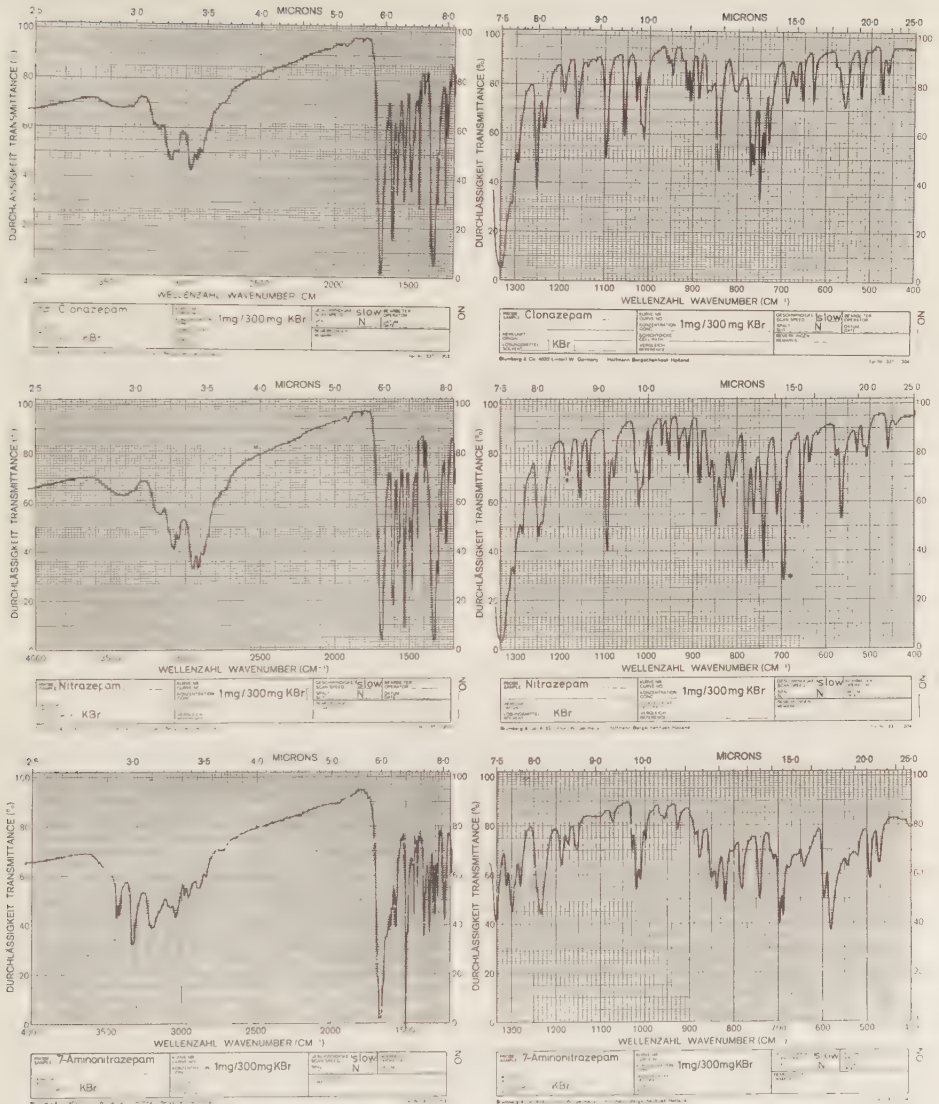
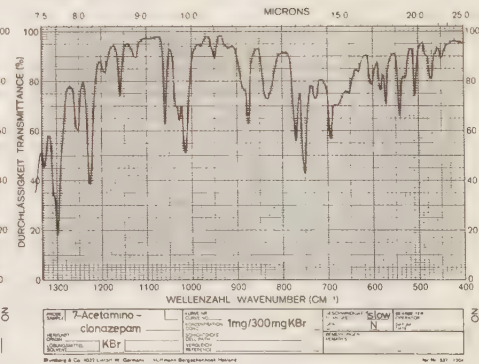
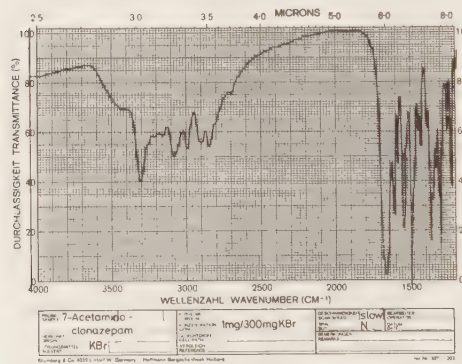
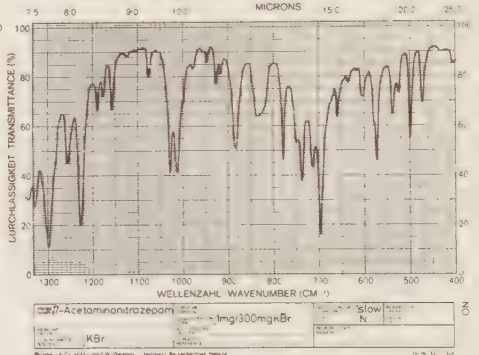
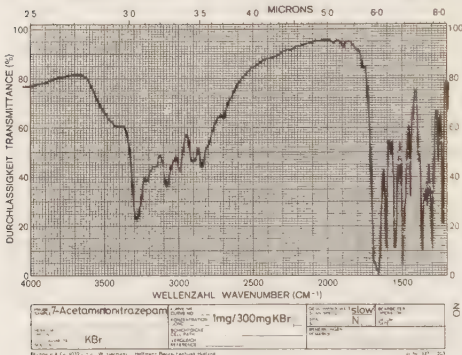
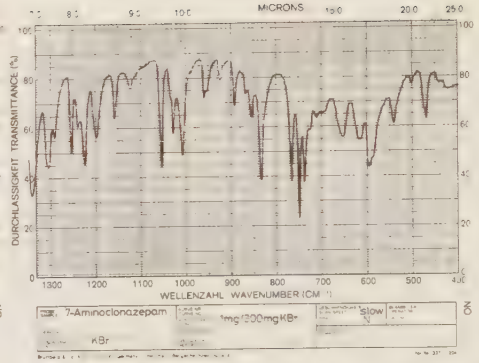
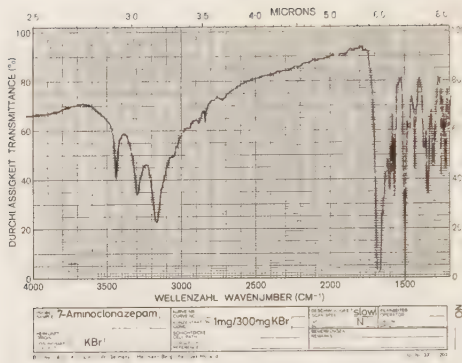
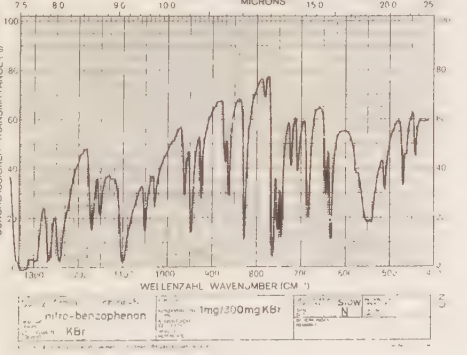
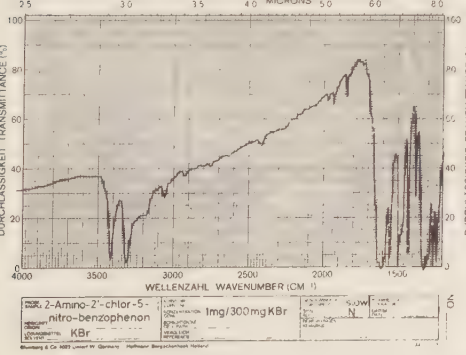
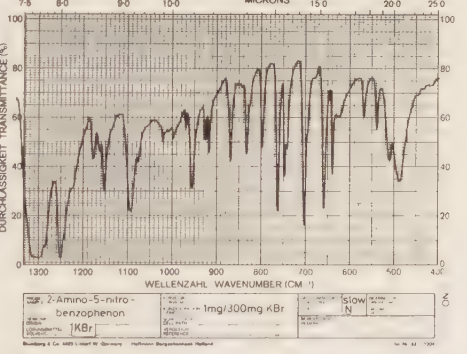
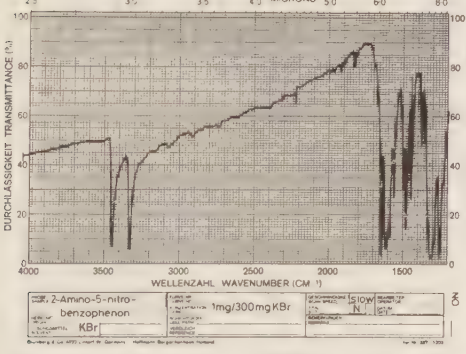
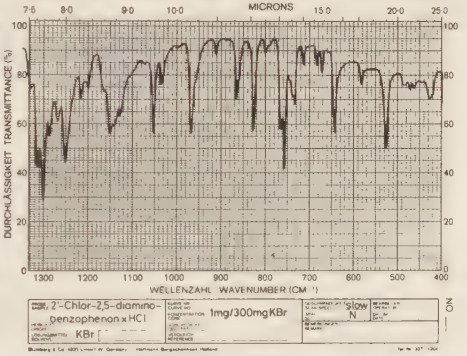
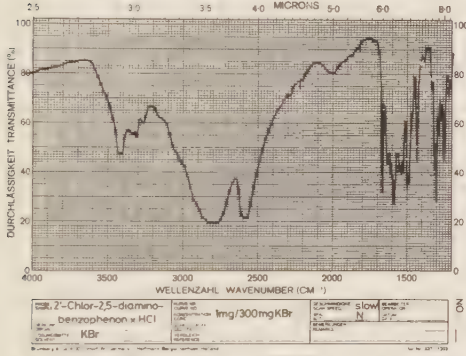
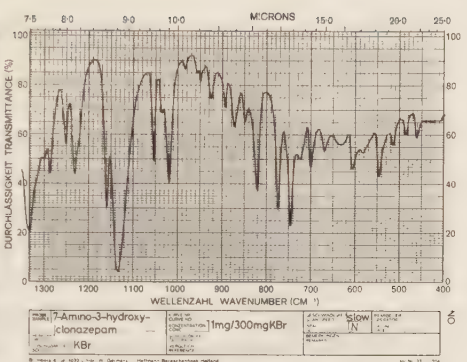
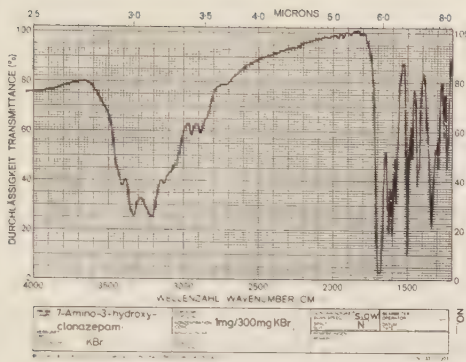


Abb.10: IR-Spektren der in Kap. 3.2.2.0.O. näher bezeichneten Substanzen (vgl. hierzu auch S. 82 und 83)





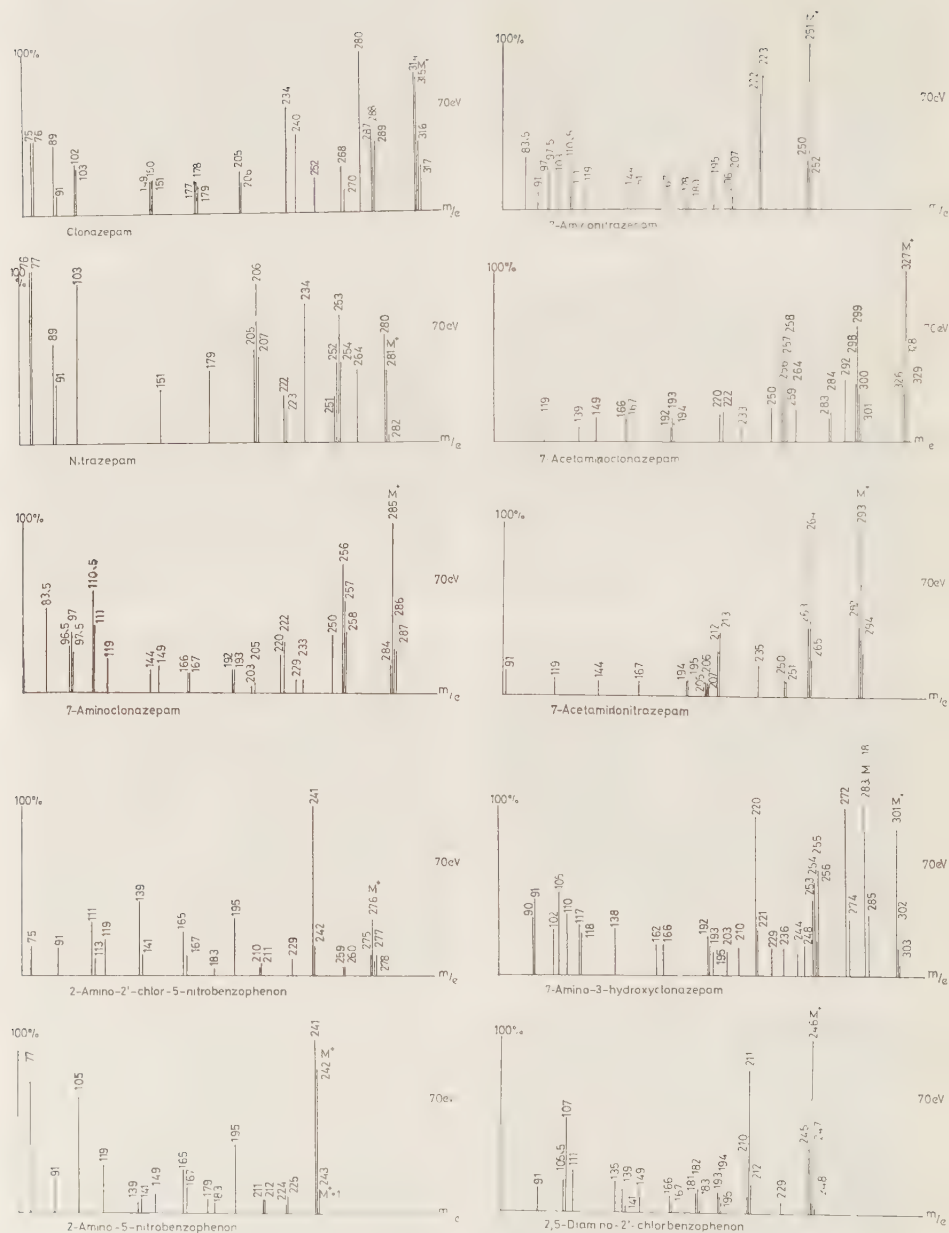


Abb.11: Massenspektren der in Kap. 3.2.2.0.0. näher bezeichneten Substanzen

3.2.2.5.2. IR-Spektren (vgl. Abb. 10 auf S. 81 f)

Insbesondere im finger-print Bereich ist eine sichere Unterscheidung der einzelnen Verbindungen möglich. Beispielsweise ist in den Verbindungen mit 5-Phenylstruktur (Nitrazepamderivate) die für den unsubstituierten Phenylring typische Absorption bei 700 und 740 cm^{-1} zu beobachten, die bei den 5-(o-Chlorphenyl)-verbindungen, die sich von Clonazepam ableiten, naturgemäß fehlt.

3.2.2.5.3. Massenspektren (vgl. Abb. 11 auf S. 84)

Mit Hilfe der M - Peaks sowie charakteristischer (M-x) - Peaks konnte die Struktur der einzelnen Verbindungen gesichert werden.

3.2.2.6.0. Günstige Extraktionsparameter für die Isolierung aus biologischem Material (vgl. auch Eschenhof (116))

Zur Isolierung der unkonjugierten Metaboliten wurden die Harnproben mit 2 N NaOH auf pH 11 gebracht und mit dem dreifachen Volumen Essigsäureäthylester 20 min in einer Schüttelmaschine extrahiert. Vorversuchsreihen ergaben, daß eine Extraktion mit Chloroform zwar zu reineren Extrakten führte, andererseits aber die Ausbeute an Clonazepamverbindungen merklich nachließ. Die organische Phase wurde im Vakuumrotationsverdampfer bei 40°C eingengt und der bei der Extraktion verbliebene wäßrige Harnrückstand zum Entfernen von Lösungsmittelresten ebenfalls einige Minuten im Rotations-

verdampfer abgezogen. Danach wurde mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt, mit β -Glucuronidase 30 U/ml / Arylsulfatase 20 U/ml (Präparat der Fa. Merck / L'industrie biologique française S.A. Gennevilliers (Seine)) bis zu einer Konzentration von 0,5 - 1,0 Vol% versetzt und schließlich 18 h bei 37° C inkubiert. Die Extraktion der freigesetzten Konjugate erfolgte bei pH 10 ebenfalls mit dem dreifachen Volumen Essigsäureäthylester, das anschließend im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt wurde.

3.2.2.7.0. Dünnschichtchromatographische Trennverfahren

Weiter oben wurde bereits ausgeführt, daß sich sowohl Clonazepam und Nitrazepam als auch die hieraus bei der sauren Hydrolyse entstehenden Benzophenonderivate selbst bei Anwendung zahlreicher unterschiedlicher Fließmittelsysteme dünnschichtchromatographisch nicht unterscheiden lassen. Über analoge Beobachtungen auch bei der dünnschichtchromatographischen Trennung der Metaboliten berichtet Eschenhof (116). Die Ergebnisse unserer Trennversuche sind in Abb. 12 wiedergegeben.

Abbildung 12: Untersuchungen zur dünnsschichtchromatographischen Trennung von Nitrazepam, Clonazepam und einigen Derivaten

Substanz	Fließmittel					
	I	II	III	IV	V	VI
Nitrazepam	0,20	0,43	0,65	0,78	0,83	0,07
Clonazepam	0,20	0,43	0,64	0,78	0,83	0,07
7-Aminonitrazepam	0,10	0,15	0,31	0,70	0,80	0,03
7-Aminoclonazepam	0,09	0,15	0,30	0,70	0,80	0,03
7-Acetamidonitrazepam	0,04	0,10	0,19	0,55	0,80	0,02
7-Acetamidoclonazepam	0,03	0,10	0,15	0,55	0,80	0,02
2-Amino-5-nitrobenzophenon	0,70	0,85	0,90	0,94	0,84	0,43
2-Amino-2'-chlor-5-nitrobenzophenon	0,70	0,85	0,90	0,94	0,84	0,43
2,5-Diamino-2'-chlorbenzophenon	0,37	0,54	0,68	0,93	0,83	0,12
7-Amino-3-hydroxycyclonazepam	0,17	0,12	0,26	0,45	0,66	0,02

I: Benzol/i-Propanol/25% NH_3 (85+15+ 5; v/v/v); II: Chloroform/Aceton (40+10; v/v); III: Essigsäureäthylester; IV: Essigsäureäthylester/ Methanol/25% NH_3 (85 + 10 + 5; v/v/v); V: Methanol/ NH_3 25% (99+ 1; v/v); VI: Toluol/Aceton (95+ 5; v/v).
Trennung auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60, aufsteigende Methode, keine besondere Aktivierung, Kammer sättigung. Nähere Einzelheiten vgl. Text.

Gleichwohl kann auch zunächst ohne die Möglichkeit einer Unterscheidung von Clonazepam und Nitrazepam mit Hilfe der herkömmlichen dünn-schichtchromatographischen Technik ein "screening-test" auf diese beiden Benzodiazepinderivate leicht durchgeführt werden, da die Abgrenzung von anderen gebräuchlichen Benzodiazepinen (z.B. Chlordiazepoxid, Diazepam, Oxazepam, Chlorazepate, Medazepam, Lorazepam, Prazepam und Flunitrazepam) ohne Schwierigkeiten möglich ist.

3.2.2.7.1. Screening-Test auf Clonazepam und Nitrazepam

Der Einsatz dieses Tests dürfte hauptsächlich auf die Untersuchung von Mageninhalt, Tablettenspuren u.ä. beschränkt sein, da im Harn aufgrund zahlreicher Untersuchungen (z.B. Rieder (60), Sawada u. Shinohara (62), Eschenhof (116)) allenfalls Spuren der unveränderten Benzodiazepine ausgeschieden werden.

Praktische Durchführung: Ein aliquoter Anteil des Untersuchungsmaterials (z.B. Mageninhalt oder Tablettenlösung) wird mit dem gleichen Volumen 25%iger HCl versetzt und 20 - 30 min unter Rückflußkühlung auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen folgt eine Neutralisation (kleine Flüssigkeitsmengen neutralisieren wir mit Natronlauge, bei größeren Ansätzen bewährte sich der Zusatz von Kaliumcarbonat / Natriumcarbonat (3+2) in kleineren Portionen, da hierbei die Neu-

tralisationsenthalpie vorwiegend in Volumenarbeit des freiwerdenden Kohlendioxids überführt wird und somit keine besondere Kühlung erforderlich macht). Anschließend wird zur Extraktion der Benzophenonderivate mit Äther ausgeschüttelt. Die Dünnschichtchromatographie der eingengten Auszüge erfolgt auf Kieselgel 60 F₂₅₄ - Fertigplatten. Eine besondere Aktivierung ist nicht erforderlich. Als Fließmittel dient Benzol. Zur Detektion wird die Platte in der weiter unten (Kap. 3.2.2.7.3.) näher beschriebenen Weise mit Stickoxiden begast, um die primären aromatischen Aminogruppen der substituierten Benzophenone zu diazotieren. Bei der anschließenden Kupplung an BRATTON-MARSHALL-Reagens bilden sich bei Clonazepam und Nitrazepam rotviolette, bei den anderen Benzodiazepinen (außer Diazepam und Prazepam) blauviolette Farbtönungen aus. Die aus Diazepam und Prazepam gebildeten Benzophenonderivate sind sekundäre Amine und folglich nicht diazotierbar. Die Detektion ist jedoch anhand der gelben Farbe sowie der Fluoreszenzlöschung bei 254 nm möglich. Für die einzelnen Benzophenonderivate ergaben sich folgende R_F-Werte:

2-Amino-5-chlorbenzophenon ¹⁾	0,34
2-Amino-2',5-dichlorbenzophenon ²⁾	0,46
2-Amino-5-nitrobenzophenon ³⁾	0,17
2-Amino-2'-chlor-5-nitro-benzophenon ⁴⁾	0,17
5-Chlor-2-cyclopropylmethylaminobenzophenon ⁵⁾	0,83
5-Chlor-2-methylaminobenzophenon ⁶⁾	0,69

Für die analytische Praxis ist es nützlich, daß 2-Amino-5-chlorbenzophenon auch nach einer Einnahme von Diazepam (VALIUM^R), Medazepam (NOBRIUM^R) und Prazepam (DEMETRIN^R) im Harn nachzuweisen ist, da die Desalkylierung insbesondere bei Diazepam und Medazepam (in geringem Umfang auch bei Prazepam) ein wichtiger Metabolisierungsschritt ist (vgl. hierzu auch Kap. 3.1.2.2.O., daselbst auch Literaturangaben).

3.2.2.7.2. Screening-Test auf 7-Amino-clonazepam und 7-Amino-nitrazepam als Hauptmetaboliten

Diese Methodik bietet sich insbesondere zum Ausschluß einer Clonazepam- und/oder Nitrazepameinnahme z.B. beim Vorliegen einer Harnprobe an, da (vgl. frühere

-
- 1) z.B. aus Oxazepam, Chlordiazepoxid, Chlorazepate
 - 2) z.B. aus Lorazepam
 - 3) z.B. aus Nitrazepam
 - 4) z.B. aus Clonazepam
 - 5) z.B. aus Prazepam
 - 6) z.B. aus Diazepam

Ausführungen) die 7-Aminoderivate sowohl bei den unkonjugierten als auch bei den gepaarten Metaboliten den Hauptanteil der Harnexkretion bilden. Grundsätzlich wäre auch hierbei eine Identifizierung über die bei der sauren Hydrolyse gebildeten Derivate 2'-Chlor-2,5-diaminobenzophenon bzw. 2,5-Diamino-benzophenon ein bequemer Weg. Bei unseren Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß ein solches Vorgehen wegen der raschen Veränderung (Oxydationsempfindlichkeit der p-Phenylendiaminstruktur insbesondere im alkalischen Milieu während der Extraktion) der Benzophenonderivate nicht empfohlen werden kann. Außer in alkalischer Lösung besteht auch im chemisorptiven Zustand nach dem Auftragen auf die Dünnschichtplatte eine extrem ausgeprägte Labilität und Zersetzlichkeit, die von Ebel u. Herold (187, 188) bereits im Zusammenhang mit dünnschichtchromatographischen Untersuchungen bedeutend stabilerer Verbindungen (z.B. Chinin und Thiabendazol) beobachtet und beschrieben wurde. So konnten wir selbst nach relativ kurzer Extraktionszeit (15 minütiges maschinelles Schütteln einer alkalischen Lösung von 2'-Chlor-2,5-diaminobenzophenon mit Essigsäureäthylester) lediglich ein polares Produkt fassen, das in allen benutzten Fließmittelsystemen am Startpunkt verblieb und mit BRATTON-MARSHALL-Reagens lediglich in einer uncharakteristischen braungelben Färbung reagierte. Weiterhin war zu beobachten, daß am Startpunkt aufgetragene frisch zubereitete 2'-Chlor-2,5-diaminobenzophenon-Base bereits nach 15 minütiger Licht- und Luftexposition nahezu vollständig zer-
setzt war.

Aus den dargelegten Gründen erwies es sich als zweckmäßig, die nach unseren Untersuchungen bedeutend stabileren 7-Amino-Verbindungen zu extrahieren, chromatographieren und nachzuweisen.

Praktische Durchführung: Ein aliquoter Anteil des Harnes wird in der unter Kap. 3.2.2.6.0. beschriebenen Weise behandelt. Ein Einzelfällen, z.B. wenn genügend Untersuchungsmaterial verfügbar ist, kann auf die enzymatische Spaltung der Konjugate verzichtet werden. Stehen jedoch nur geringe Mengen Untersuchungsmaterial zur Analyse an, so empfiehlt sich die zusätzliche Erfassung des aus den Konjugaten frei gesetzten Anteils der ausgeschiedenen 7-Amino-Verbindung, da im Hinblick auf die relativ geringe Applikationsdosis insbesondere bei Clonazepam hauptsächlich bei stark verdünnten Harnproben (oft im Zusammenhang mit Verkehrsdelikten nach reichlichem Flüssigkeitsgenuß beobachtet) und längerem zeitlichem Abstand der Urinentnahme vom Einnahmezeitpunkt u.U. erst mit der *S u m m e* aus nicht gebundenem und konjugiertem 7-Aminoclonazepam bzw. 7-Aminonitrazepam die Nachweisgrenze sicher erreicht wird.

Der Extrakt bzw. die vereinigten Extrakte werden auf Kieselgel 60 F₂₅₄ mit dem Laufmittel Benzol / i-Propanol / Ammoniak (25%) (80 + 20 + 1; v/v/v) getrennt. Die Detektion erfolgt nach BRATTON-MARSHALL (vgl. Kap. 3.2.2.7.3.). Bei den Untersuchungen konnten wir neben den 7-Aminoverbindungen (hR_f -Wert 48) noch die 7-Amino-3-hydroxy-verbindung (hR_f -Wert 35) nach-

weisen, letztere allerdings in beträchtlich geringerer Menge. Die Spezifität des Nachweises wird aber durch die zusätzliche Erfassung dieses Metaboliten deutlich erhöht. Es ergaben sich blauviolette Azofarbstoffe.

3.2.2.7.3. Methodik zur Unterscheidung von Clonazepam und Nitrazepam mit Hilfe der TRT-Technik und Reaktionschromatographie

Gestatten es die bisher beschriebenen "screening-tests" lediglich, die beiden Benzodiazepine Clonazepam und Nitrazepam bzw. ihre Hauptstoffwechselprodukte in ihrer Gesamtheit entweder auszuschließen oder nachzuweisen, so ist es mit Hilfe der nachstehend mitgeteilten Methode mittels TRT-Technik und Reaktionschromatographie möglich, eine eindeutige Unterscheidung zu treffen.

Prinzip der Methode: Bei zahlreichen dünnschichtchromatographischen Trennversuchen (vgl. Abb. 12 auf S. 87) fiel auf, daß sich mit dem Fließmittel Essigsäureäthylester auf Kieselgel 60 Ansätze einer Trennung abzeichneten, die bei den 7-Acetamidoderivaten trotz der vergleichsweise kleinsten Laufstrecke am ausgeprägtesten waren (R_F -Werte: 19 bei 7-Acetamidonitrazepam bzw. 15 bei 7-Acetamidoclonazepam). Eine Verlängerung der Laufstrecke bis zur vollständigen Plattenlänge (20 cm) erbrachte weitere Verbesserungen, obwohl eine Trennung der Originalbenzodiazepine (Clonazepam und Nitrazepam) sowie der 7-Aminoderivate auch auf diese Weise nicht gelang.

Optimale Trennergebnisse für das Substanzpaar 7-Acetamidoclonazepam bzw. 7-Acetamidonitrazepam ergaben sich bei Verwendung einer SHANDON-Durchflußkammer nach TRUTER zur kontinuierlichen Dünnschichtchromatographie (s. Abb. 13 auf S. 95)⁺. Bei dieser Trennkammer ragt ein Ende der Platte geringfügig aus der Kammer, so daß dort angekommenes Fließmittel ständig abdampft, wodurch eine kontinuierliche Entwicklung gewährleistet ist. Bei genügend langer Laufzeit ergeben sich so theoretische Laufstrecken für die Fließmittelfront, die ein Vielfaches der Plattenlänge betragen können. Ein gewisser Nachteil dieser Technik liegt im Erkennen der optimalen Entwicklungsdauer, d.h. in der Detektion, da ein Herausnehmen der Platte zur Beurteilung des Trennergebnisses ohne Unterbrechung des Trennvorganges nicht möglich ist. Im vorliegenden Fall konnte dieses Problem mittels gelegentlicher Bestrahlung mit der UV-Betrachtungslampe durch einen Schlitz im Kammerdeckel gelöst werden, wobei die Substanzflecke dank der fehlenden Eigenabsorption des benutzten Fließmittels Essigsäureäthylester im Bereich oberhalb 250 nm deutlich geortet werden konnten.

In Abb. 14 (auf S. 96) sind Trennergebnisse nach verschiedenen Laufzeiten (A nach 60 min; B nach 120 min; C nach 180 min) dargestellt. Nähere Einzelheiten können der Abbildungslegende entnommen werden. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich

⁺ Best.Nr. 2852 d. Fa. SHANDON Labortechnik GmbH,
Karl-von-Drais-Str. 18, 6000 Frankfurt 50



Abb. 13: Durchflußkammer nach TRUTER zur kontinuierlichen Dünnschichtchromatographie
(nähere Einzelheiten vgl. Text)

Clonazepam und Nitrazepam selbst bei Anwendung dieser relativ aufwendigen Technik nicht unterscheiden lassen. Vielmehr gelingt eine Trennung der 7-Amino- und insbesondere der 7-Acetamidoderivate. Auf diesem Sachverhalt beruht das Prinzip der nachstehend mitgeteilten Methode:

Clonazepam und Nitrazepam werden am Startpunkt der 2. Laufrichtung auf der Dünnschichtplatte zu den 7-Aminoderivaten reduziert und anschließend in die 7-Acetamidoverbindungen überführt, die sich mit Hilfe der kontinuierlichen Entwicklungstechnik gut unterscheiden lassen. Analog wird bei der Trennung von 7-Aminoclonazepam und 7-Aminonitrazepam verfahren, wobei der Reduktionsschritt natürlich überflüssig ist, da die Reduktion bereits im Rahmen der Biotransformation erfolgte.

Praktische Durchführung (vgl. auch Kap. 3.1.2.4.1.)

Chemikalien (analysenreine Qualitäten):

Ammoniak 25%

Essigsäureäthylester

Natriumnitrit

Essigsäureanhydrid

Salzsäure 25 % oder 37 %

Harnstoff

Titan(III)chloridlösung
(Art.Nr. 808307 MERCK)

N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin

N,N-Dimethylformamid

Wasser (dest.)

Fließmittel I: Essigsäureäthylester

Fließmittel II: Essigsäureäthylester / Essigsäureanhydrid (99 + 1; v/v)

BRATTON-MARSHALL-Reagens: 1 g N-(1-Naphthyl)-äthylen-diamin wird in 50 ml N,N-Dimethylformamid und 50 ml 4 N HCl gelöst. Die erkaltete Lösung wird filtriert. Aufbewahrung im Kühlschrank. (Vgl. auch (46) und Kap. 3.1.2.4.1.)

Geräte:

Standardausrüstung für die Dünnschichtchromatographie nach STAHL (1),

Durchflußkammer (nähere Angaben s.o.)

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) (z.B. Art.Nr. 5715 MERCK) ohne besondere Aktivierung

(Aktivierungsversuche bei 110° C und 1 h Dauer verschlechterten die Trennergebnisse sogar geringfügig).

Methodik:

Ein nach der unter Kap. 3.2.2.6.0. beschriebenen Verfahrensweise gewonnener Extrakt wird am Startpunkt einer nach der zweidimensionalen Technik eingeteilten Dünnschichtplatte aufgetragen. Zu Referenzzwecken werden auf den in Abb. 15 (s. S.101) mit R₁ - R₆ gekennzeichneten Stellen der DC-Platte die Benzodiazepine Clonazepam (R₁), Nitrazepam (R₂), 7-Aminoclonazepam (R₃), 7-Aminonitrazepam (R₄), 7-Acetamidoclonazepam (R₅) und 7-Acetamidonitrazepam (R₆) mitgeführt. Anschließend wird in der ersten Laufrichtung mit Essigsäureäthylester kontinuierlich etwa 60 - 120 min (UV-Kontrolle durch Kammerdeckelschlitz) entwickelt. Nach dem Herausnehmen und Trocknen der Platte erfolgt die Reduktion durch gleichmäßiges, aber nicht zu sattes Besprühen des in Abb. 15 schraffiert gekennzeichneten

neten Sektors mit Titan(III)chloridlösung. Anschließend wird die Platte mit kalter oder allenfalls warmer (keinesfalls heißer) Luft etwa 10 min lang getrocknet, wobei die graublaue Färbung des TiCl_3 -Sprays verschwindet und die DC-Platte wieder weiß wird. Dies kann am bequemsten mit einem Heizlüfter bei ausgeschalteter oder höchstens schwacher Heizstufe erfolgen. Bei höheren Temperaturen wäre mit einer sauren Hydrolyse der Benzodiazepine zu rechnen, da die zur Reduktion benutzte Titan(III)-Lösung deutlich sauer reagiert. Aus diesem Grund liegen auch die bei der Reduktion gebildeten sowie die nach der Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial nach Körperpassage evtl. bereits vorhandenen primären aromatischen Amine als Hydrochloride auf der DC-Platte vor und müssen vor der Entwicklung in der zweiten Dimension in die Basen überführt werden, da nur in dieser Form ein befriedigendes chromatographisches Trennverhalten gegeben ist. Dies geschieht durch 2 minütiges Einstellen der Platte in eine geschlossene Glaskammer, die Ammoniakdämpfe (Becherglas mit etwas Ammoniak 25% auf dem Boden der Kammer) enthält. Zur Acetylierung wird das in der oben beschriebenen Weise behandelte Chromatogramm in der zweiten Laufrichtung mit Essigsäureäthylester /Essigsäureanhydrid (99 + 1; v/v) entwickelt. Hierbei bilden sich die Acetaminoderivate nach unseren Beobachtungen bereits am Startpunkt oder unmittelbar in seiner Nähe, was als weiteres Indiz für die erhöhte Reaktionsfähigkeit vieler Verbindungen im Zustand des Chemiesorpts auf dem Trägermaterial von Dünnschichtchromatogrammen gelten kann. Auf dem Vergleichsfeld der 2. Dimension werden bei R_7 und R_8 die Referenzsubstanzen 7-Acetamidoclonazepam bzw. 7-Acetamidonitrazepam mitgeführt.

Die Detektion wird in der folgenden Weise vorgenommen:
Die in der zweiten Dimension mit Äthylacetat / Acetanhydrid etwa 60 - 90 min entwickelte Platte (auch hier ist die kontinuierliche Verlaufskontrolle durch Bestrahlen mit UV-Licht möglich) wird abgelüftet und zur Bildung der primären aromatischen Benzophenon derivate auf ihrer ganzen Fläche mit 25 %iger Salzsäure eingesprüht. Die so behandelte Platte wird mit einem Glas gleicher Größe bedeckt und im Trockenschrank etwa 10 min bei 100° C erhitzt. Die Deckplatte wird nun entfernt und das Chromatogramm für weitere 5 min bei der angegebenen Temperatur belassen, um überschüssige Säure und Feuchtigkeit zu entfernen. Die anschließend zur Erhöhung der Ausbeute bei der Diazotierungsreaktion gut abgekühlte Platte (Kühlschrank) wird in eine weitere Kammer gebracht, die nitrose Gase (darunter N_2O_3) enthält (Becherglas mit ca. 20 %iger wässriger Natriumnitritlösung in der Kammer; durch eine Öffnung im Deckel der Kammer mit einer Pipette 25 %ige Salzsäure bis zur Nitrosegasentwicklung zufließen lassen; Abzug !). Hierbei erfolgt während einer Verweildauer von 3 - 5 min die Diazotierung der primären aromatischen Aminogruppen. Nach dem Herausnehmen der Platte läßt man die noch anhaftenden nitrosen Gase unter dem Abzug völlig abdampfen (etwa 30 - 40 min). In Eilfällen genügt es auch, die Platte nach nur etwa 5 min Ablüften schwach mit 1 %iger wässriger Harnstofflösung zur Beseitigung der bei der anschließenden Kupplung störenden nitrosen Gase zu besprühen. Die Kupplung mit BRATTON-MARSHALL-Reagens liefert blauviolette Azofarbstoffe. Sie erfolgt durch gleichmäßiges Besprühen der Platte mit dem angegebenen Reagens. Erfassungsgrenze: Etwa 0,02 Mikrogramm / Fleck.

Bezeichnung der Ziffern in Abb. 15

R₁ = Clonazepam

R₂ = Nitrazepam

R₃ = 7-Aminoclonazepam

R₄ = 7-Aminonitrazepam

R₅ = 7-Acetamidoclonazepam

R₆ = 7-Acetamidonitrazepam

R₇ = 7-Acetamidoclonazepam

R₈ = 7-Acetamidonitrazepam

Am Startpunkt des zweidimensionalen Hauptfeldes (mit X bezeichnet) wurde ein Gemisch der Referenzsubstanzen R₁ - R₆ aufgetragen. An der mit X gekennzeichneten Stelle des Chromatogrammes konnte bei der Aufarbeitung von Harnextrakten der Metabolit 7-Amino-3-hydroxy-clonazepam angefärbt werden.



3.2.2.8.0. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Abb. 15 (s. S. 101) dargestellt.

3.2.2.9.0. Diskussion der Ergebnisse

Aus den in Abb. 15 (s. S. 101) dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß mit Hilfe der mitgeteilten Methodik eine deutliche Unterscheidung der Benzodiazepine Clonazepam / Nitrazepam sowie ihrer korrespondierenden Metaboliten möglich ist. Der zur Erzielung der Ergebnisse eingeschlagene Weg erscheint auf den ersten Blick vielleicht etwas kompliziert, wenn nicht sogar umständlich. Es sei aber erwähnt, daß der zeitliche Aufwand nur unwesentlich über dem bei einer zweidimensionalen Trennung üblichen liegt.

Bei einer entsprechenden Ausstattung der Untersuchungsstelle und genügend Untersuchungsmaterial wird man zwar einer spektroskopischen Differenzierung (vorzugsweise MS und IR) den Vorzug geben. Für die von uns vorgeschlagene Methodik sprechen u.E. jedoch folgende Vorteile:

a) Durchführbarkeit mit relativ einfachen und wirtschaftlich tragbaren Mitteln, d.h. Einsatzmöglichkeit im Apothekenlabor, das nach Band I des Europäischen Arzneibuchs mit den entsprechenden Geräten (mit Ausnahme der Durchflußkammer) ausgestattet sein muß (vgl. hierzu Ausführungen von Gräfe (101)).

b) Erhöhte Spezifität, da verglichen mit konventionellen dünn-schichtchromatographischen Trennungen (z.B. Basen-DC mit Jodoplateat- oder DRAGENDORFF-Detektion) der positive Nachweis an mehrere Substanzeigenschaften gebunden ist (z.B. Bildung eines primären aromatischen Amins bei der Reduktion und Hydrolyse, Wanderung in der zweiten Laufrichtung als Acetaminoderivat, differenziertere Farbtöne der Azoverbindung verglichen mit Jodoplateat- oder DRAGENDORFF-Anfärbungen).

c) Hohe Empfindlichkeit bei geringem Reinheitsanspruch an die Probe.

d) Besondere Bedeutung der Dünnschichtchromatographie im Rahmen der Benzodiazepinanalyse, da insbesondere die gaschromatographische Untersuchung der nitrosubstituierten Benzodiazepine (außer den beiden hier behandelten Verbindungen wäre hierzu noch das neue Benzodiazepin *F l u n i t r a z e p a m* (7-Nitro-5-(O-fluorphenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) zu zählen, das aber anhand seines bei der sauren Hydrolyse gebildeten Derivates 2-Methylamino-5-nitro-2'-fluorobenzophenon leicht von Clonazepam und Nitrazepam zu unterscheiden ist) im Hinblick auf die bei der Biotransformation entstehenden 7-Aminoderivate mit größeren Schwierigkeiten verbunden ist. Vgl. hierzu auch De Silva et al. (83). Die letztgenannten Autoren empfehlen für die analytische Erfassung der Aminoderivate ebenfalls nicht gaschromatogra-

phische Methoden sondern bedienen sich der "pulse polarography", eines Verfahrens also, das sicher auch nur an wenigen Untersuchungsstellen durchgeführt werden kann.

Die mitgeteilte Methode dürfte ein weiterer Beweis für die vielseitige und nutzbringende Anwendbarkeit der TRT-Technik und der Reaktionschromatographie sein.

Nach einem Vorschlag von STAHL (pers. Mitt.) sollte der in der dünn-schichtchromatographischen Literatur vereinzelt auch für die TRT-Technik benutzte Ausdruck Reaktionschromatographie auf die Methoden beschränkt werden, bei denen ein Fließmittel eine Reaktion mit der zu trennenden Verbindung bewirkt (beispielsweise die in unserer Arbeit beschriebene Acetylierung der 7-Aminoverbindungen mit dem Laufmittel Äthylacetat / Acetanhydrid).

3.2.3.0.0. Derivatisierung durch andere Reaktionen

3.2.3.1.0. Halogenierung

Bei Versuchen zur Halogenierung auf der DC-Platte konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Fluorierungen führten zu einer völligen Zerstörung des Substrates.

Auch bei Chlorierungen überwogen oxidative Prozesse. Weiterhin bewirkte die geringe Selektivität von Chlor meist eine große Anzahl von schwer definierbaren Folgeprodukten.

Befriedigende Ergebnisse wurden bei der Bromierung beobachtet: Zwar standen auch hier Oxydationen im Vordergrund, wozu sicher der aktivierte Zustand auf dem Sorbens maßgeblich beitrug. Es konnten jedoch auch klassische Bromierungsreaktionen (z.B. an Aromaten und anderen π -Elektronensystemen) nachgewiesen werden. Brom eignet sich insbesondere im Hinblick auf seine günstigen physikalischen Eigenschaften (bequeme Dosierbarkeit, günstiger Siedepunkt) und seine hohe Selektivität für Halogenierungen auf der DC-Platte.

Da Halogenierungen in bezug auf die Nachweisbarkeit keine nennenswerte Verbesserung mit sich bringen (wenn man etwa mit der Einführung einer prim. Aminogruppe oder einer Carbonylgruppe in ein Mole-

kül vergleicht, vgl. auch Ausführungen unter 3.2.3.2.0.), wurde dieser Reaktionstypus vom analytischen Aspekt her nicht weiter vertieft. Eine größere Bedeutung dürfte sich für Halogenierungen mit präparativer Aufgabenstellung ergeben (vgl. d. 2. Teil d. Arb.), da die hierbei zugänglichen Alkylhalogenide Ausgangspunkt für sehr viele Umsetzungen sein können.

Ein praktisches Beispiel für Bromierungen wurde im Rahmen der Barbituratanalytik beschrieben (13, 14, 15).

Umsetzungen mit Jod sind seit langem insbesondere in der Steroidanalyse als Detektionsmittel bekannt (1).

3.2.3.2.0. Nitrierung

Durch die Einführung einer Nitrogruppe in eine Struktur wird die Möglichkeit eröffnet, nach Reduktion und Diazotierung die sehr empfindliche und auch weitgehend spezifische Nachweisreaktion nach BRATTON-MARSHALL anzuwenden (nähere Einzelheiten hierzu vgl. Kap. 3.1.1.2.2., 3.1.2.4.1., 3.2.1.3.0. und 3.2.2.7.3.).

Um oxidative Prozesse zu vermeiden, ist es bei Nitrierungen erforderlich, das Nitrierungsmittel der Reaktivität des jeweiligen Aromaten anzupassen. So werden Phenole und Phenoläther z.B. bereits

durch Besprühen mit verdünnter Salpetersäure nitriert, während reaktionsträgere Strukturen den Einsatz von Nitriersäure (z.B. 10 Teile 100 %ige Salpetersäure und 14 Teile konz. Schwefelsäure) erforderlich machen. Unsere Untersuchungen zeigten, daß beim Behandeln mit Nitriersäure lediglich eine Zerstörung des Fluoreszenzindikators der DC-Platte erfolgte. Die Trennqualität war jedoch auch nach der Behandlung weitestgehend befriedigend.

Da die Nitrogruppe die Reaktionsfähigkeit des Aromaten gegenüber elektrophilen Substitutionen stark herabsetzt, besteht die Gefahr der Zweitnitrierung nur bei sehr reaktionsfähigen Aromaten. Meist entstehen jedoch Isomerengemische, vor allem die o- und p-Isomeren.

Nitrierungen auf der DC-Platte konnten bei folgenden Einzelverbindungen erfolgreich durchgeführt werden:

Phenobarbital (dadurch bequeme Unterscheidung von anderen nichtaromatischen Barbituraten; Nitrierung mit Nitriersäure),

Diphenhydramin (dadurch höhere Spezifität des Nachweises verglichen etwa mit Kaliumjodoplateat- oder DRAGEN-DORFF-Spray; Nitrierung mit Nitriersäure),

- Glutethimid (dadurch empfindlicher Nachweis, da sonst kaum geeignete Sprühreagentien); Nitrierung mit Nitriersäure),
- Aminophenazon (dadurch erhöhte Spezifität des Nachweises, da sich bereits beim Behandeln mit Nitrosegasen 3 mit BRATTON-MARSHALL anzufärbende Derivate bilden).

Die Reduktion der Nitrogruppen erfolgte in allen Fällen durch Besprühen mit Titan(III)-chlorid; vgl. Kap. 3.1.1.2.2.

3.2.3.3.0. Oxydation (insbesondere N-Oxid und Sulfoxidbildung)

Sulfoxide und Sulfone von Phenothiazinen bilden sich auf der DC-Platte oft bereits nach längerer Luftexposition. Sie können bei der nachfolgenden dünnschichtchromatographischen Trennung die Spezifität des Nachweises erhöhen (6). Die Umsetzung kann durch Tüpfeln des Startpunktes mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung wesentlich beschleunigt werden.

3.2.3.4.0. Hydroxylierung

Diese insbesondere für die Darstellung präparativ sonst schwierig zugänglicher Metaboliten wichtige Reaktion wird in einer praktischen Durchführungsform in Kap. 4.5.0.0.0. ausführlich beschrieben.

3.2.3.5.0. Diazotierung und Azokupplung

Vgl. hierzu die Kap. 3.1.1.2.2., 3.1.2.4.1., 3.2.1.3.0. und 3.2.2.7.3.

Die Diazotierung in der Gasphase hat den Vorteil eines nahezu quantitativen Umsatzes. Für spezielle Zwecke kann jedoch auch durch Besprühen mit saurer Natriumnitritlösung diazotiert werden. Weiterhin sind Varianten in bezug auf das Kupplungsreagens (z.B. β -Naphthol) in Gebrauch (53).

3.2.3.6.0. Umlagerungen

Als Beispiele für Umlagerungen auf der DC-Platte sollen die in Kap. 3.1.1.0.0. beschriebene Rearomatisierung von Nifedipin zum Nitrosoderivat und die Acylgruppenwanderung bei der Darstellung der 3-Hydroxybenzodiazepine (vgl. 4.5.0.0.0.) angeführt werden.

4.0.0.0.0. Reaktionen auf der DC-Platte für präparative Zwecke

4.1.0.0.0. Allgemeine Ausführungen

Wie aus Kap. 7.0.0.0.0. ersichtlich ist, wurden dünn-schichtchromatographische Methoden z.B. im Rahmen der Benzodiazepinanalytik in außerordentlicher Vielfalt zum Einsatz gebracht. Auf Durchführungsmöglichkeiten chemischer Reaktionen auf der Platte für präparative Zwecke wird dagegen im durchgesehenen Schrifttum nicht eingegangen.

Bei den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Reaktionen konnte wiederholt beobachtet werden, daß der Ablauf vielfach in hoher Ausbeute und in vergleichsweise kurzen Zeiträumen bewerkstelligt wurde.

Selbstverständlich ist die Durchführungsmöglichkeit einer Reaktion auf der Dünnschichtplatte mengenmäßig nur für kleinere Ansätze geeignet. Die Ergebnisse, die im einzelnen in Kap. 5.0.0.0.0. aufgezeigt und diskutiert werden, sind u.E. jedoch so überzeugend, daß ein Einsatz der Methode für Spezialzwecke gerechtfertigt erscheint und dann eindeutige Vorteile bietet.

Nachstehend sollen Präparationsmöglichkeiten für Arzneimittelmetaboliten an mehreren Beispielen beschrieben und demonstriert werden.

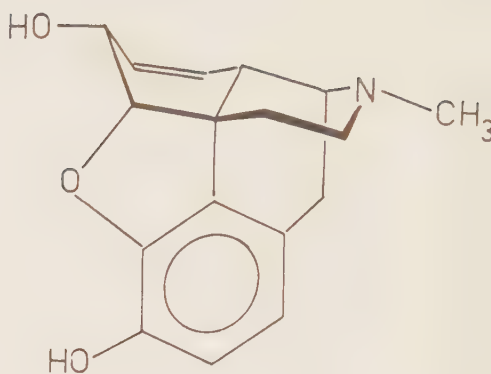
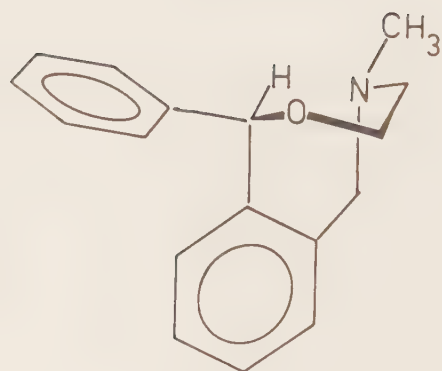
4.2.0.0.0. Darstellung von Nefopam-N-Oxid aus Nefopam

4.2.1.0.0. Zur Analytik von Nefopam, Nor-Nefopam und Nefopam-N-Oxid

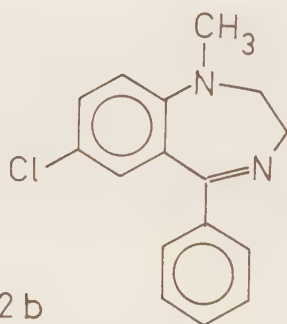
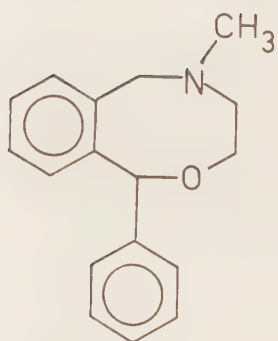
Seit Februar 1976 wird Nefopam (3,4,5,6-Tetrahydro-5-methyl-1-phenyl-1H-2,5-benzoxazocin-hydrochlorid) in Form der Spezialität AJAN^R auf dem Arzneimittelmarkt der Bundesrepublik Deutschland als starkes Analgetikum vertrieben.⁺ Nach Angaben des Herstellers besitzen 20 mg AJAN^R die Wirksamkeit von 12 mg Morphin. Die unerwünschten Begleiterscheinungen von Morphin (Sedierung, Beeinträchtigung der geistigen Leistungsfähigkeit, Atemdepression, Toleranz und Suchtbildung) sollen bei AJAN^R fehlen, bei höherer Dosierung müsse jedoch mit einer Verminderung des Reaktionsvermögens gerechnet werden (517).

Nefopam läßt sich nicht ohne weiteres in eine strukturelle Abhängigkeit zum Morphin bringen (Formel 1b), zeigt jedoch in seinem allgemeinen Aufbau formale Ähnlichkeiten mit Benzodiazepinen (Formel 2b) und mit den als Antihistaminika verwendeten Diphenylmethanderivaten vom Kolamintyp (Formel 3b).

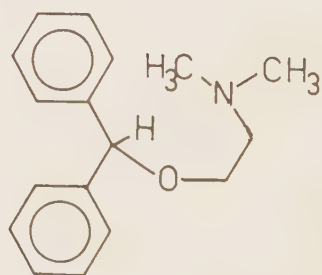
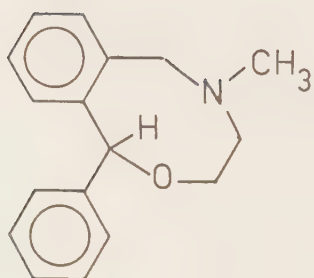
⁺) Bereits im Jahre 1969 war dieselbe Substanz (als Fenazoxin bezeichnet) von Bassett et al. (530) als Antidepressivum empfohlen worden.



1 b



2 b



3 b

Nach einer Auskunft der Herstellerfirma wurden wissenschaftliche Arbeiten zum Nachweis und zur Biotransformation von Nefopam (AJAN^R) bisher noch nicht publiziert. Aus diesem Grund und im Hinblick auf die besondere forensisch-chemische Bedeutung dieses Präparates (Notfallanalyse bei Intoxikationen, evtl. Überwachung bei Mißbrauch, Untersuchungen im verkehrsmedizinischen Bereich wegen möglicher Auswirkungen auf das Reaktionsvermögen u.a.) leiteten wir zunächst entsprechende Untersuchungen zum Nachweis und zur Biotransformation von Nefopam ein.

4.2.1.1.0. Allgemeines (Struktur, allgemeine Daten)

Summenformel: $C_{17}H_{19}NO$, $C_{17}H_{19}NO \cdot HCl$ Molekulargewicht: Base: 253,3 Hydrochlorid: 289,8 Löslichkeit: Base: in den meisten organischen Lösungsmitteln gut bis sehr gut löslich, extrahierbar aus alkalischer wässriger Lösung mit z.B. Cyclohexan, Essigsäureäthylester. Hydrochlorid: löslich in 35 T. Wasser, 20 T. Methanol, 90 T. Chloroform praktisch unlöslich in Benzol und anderen unpolaren Lösungsmitteln. Schmelzpunkt: Base: kein definierter Fp. Hydrochlorid: $249 - 255^{\circ}C$ (Zers.) Pikrat: $134^{\circ}C$ (aus Äthanol) Handelsform: Filmtabletten: 30 mg Nefopam·HCl/Tablette, Überzug aus Hydroxypropylmethylzellulose $\varnothing$ 7.1 mm, Randdicke 2.2 mm, Mittendicke 4.3 mm, Gewicht 220 mg, Farbe: weiß Ampullen: 20 mg/ml Nefopam HCl, 1.1 ml Inhalt.

Identitätsreaktion:

Eine Spur Substanz wird mit 0.5 ml Schwefelsäure unter Zugabe von wenig Paraformaldehyd versetzt, es tritt eine grünliche Fluoreszenz auf, die beim Verdünnen mit Wasser in eine blaue Fluoreszenz umschlägt. Diese Reaktion wird von einer Reihe von Diphenylmethan-derivaten gegeben (518).

4.2.1.2.0. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

4.2.1.2.1. Qualitative Trennung

Zur Unterscheidung von anderen starken Analgetika eignen sich die in Tabelle a) angegebenen Fließmittel. Untersuchungsergebnisse zur Trennung der Metaboliten sind in Tabelle b) dargestellt. Zum Nachweis von Morphinderivaten s. auch (107) und (519).

Tabelle a): Trennung von anderen starken Analgetika

Substanz	Fließmittel				
	I	II	III	IV	V
Morphin	0,15	0,13	0,29	0,31	0,09
Dihydromorphin	0,08	0,16	0,28	0,23	0,07
Codein	0,20	0,25	0,43	0,40	0,22
Dihydrocodein	0,18	0,21	0,33	0,31	0,18
Hydrocodon	0,13	0,28	0,41	0,28	0,15
Oxycodon	0,4 ⁺	0,6 ⁺	0,70	0,61	0,5 ⁺
Codethylin	0,25	0,26	0,46	0,42	0,27
Pethidin	0,46	0,49	0,61	0,56	0,47
Ketobemidon	0,26		0,43	0,43	0,30
Methadon	0,51	0,66	0,68	0,60	0,60
Tilidin	0,63	0,45	0,81	0,70	0,75
Nefopam	0,38	0,80	0,59	0,53	0,45

Fließmittel:
 I: 1-Propanol/25%
 NH₃ (50+ 3; v/v)
 II: Acetonitril/
 25% NH₃ (50+ 5; v/v)
 III: Acetonitril/
 Methanol/25% NH₃
 (40+10+ 3; v/v/v)
 IV: Acetonitril/
 Äthanol/25% NH₃
 (25+50+ 3; v/v/v)
 V: Essigsäureäthylester/
 Methanol/25% NH₃
 (85+10+ 5; v/v/v)

⁺) langgezogener Fleck

Tabelle b): Trennung der Metaboliten

Substanz	Fließmittel					V	
	I	II	III	IV			
Nefopam	0,65	0,63	0,78	0,45	0,15	Fließmittel:	
Nor-Nefopam	0,55	0,48	0,60	0,17	0,00	I: Methanol/25% NH ₃ (99+1; v/v)	
Nefopam-N-Oxid	0,47	0,06	0,15	0,18	0,00	II: Benzol/1-Propanol, 25% NH ₃ (80+20+1; v/v/v)	
Phenolische Hauptkomponente nach Fermenthydrolyse	0,76	0,42					
Codein	0,50	0,30	0,47	0,20	0,02	III: Essigsäureäthylester/Methanol/ 25% NH ₃ (85+10+5; v/v/v)	
Coffein	0,75	0,55	0,66			IV: Chloroform/Äthanol (90+10; v/v)	
Diphenhydramin	0,65	0,72	0,89	0,35	0,10		
Mepivacain		0,68	0,81				

V: Chloroform/Aceton

(80+20; v/v)

Als Referenzsubstanzen wurden die häufig für diesen Zweck benutzten Wirkstoffe Codein, Coffein und Diphenhydramin mitgeführt.

Die Angabe von R_f-Werten des Mepivacain erfolgte wegen der Ähnlichkeit der UV-Spektren dieses Wirkstoffes mit denen von Nefopam und Nor-Nefopam.

Arbeitsbedingungen

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄; E. Merck, Darmstadt. Aufsteigende Methode, Kammersättigung, keine besondere Aktivierung der DC-Platten.

Ergänzend hierzu wären folgende Detektionsmöglichkeiten zu nennen (die arabischen Ziffern beziehen sich auf die Substanznummern in Tabelle b):

- a) DRAGENDORFF-Reagens nach Munier und Macheboeuf (näheres vgl. (1), S. 829, Nr. 89): Gelbbraune Farbreaktion mit Substanz 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8.
- b) Jodoplateat (Kaliumjodoplateat) nach Smith (näheres vgl. (1), S. 837, Nr. 140): Blauschwarze Färbung mit Substanz 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8.
- c) Bromkresolgrün: Stahlblaue Farbtönung mit 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8.
- d) FOLIN-CIOCALTEUS-Reagens (näheres vgl. (1), S. 832, Nr. 108): Dunkelblaue Farbreaktion mit phenolischen Substanzen (z.B. Subst. 4).

Als Referenzsubstanzen wurden die häufig zu diesem Zweck benutzten Wirkstoffe Codein, Coffein und Diphenhydramin mit angeführt. Die Angabe von R_f-Werten des Mepivacain erfolgte wegen der Ähnlichkeiten der UV-Spektren dieses Wirkstoffes mit denen von Nefopam und Nor-Nefopam.

4.2.1.2.2. Quantitative Bestimmung durch Remissions- messung

Auftragelösung:	30 mg Nefopam HCl 25 mg Phenazon als interner Standard werden zu 25.0 ml mit Wasser gelöst.
Entwicklung:	Sandwichkammer
DC-Platten:	DC-Fertigplatten Kieselgel 60, 20 x 20 cm Hersteller E. Merck, Darm- stadt
Auftragetechnik:	1.20 µg 1 µl Kapillaren (Microcaps; Drummond Scientific; Vertrieb: Shandon Labortechnik, Frankfurt)
Fließmittel:	Äthanol 50 25 % NH ₃ 3 (Qualität; E. Merck, Darmstadt)
Laufstrecke:	8 cm
Rf-Werte:	Nefopam 0.41 Phenazon 0.69
Meßtechnik:	Zweistrahl-DC-Spektralfotometer, Schoeffel SD 3000 Meßwellenlänge 265 nm Meßspalt ca. 6 x 0.3 mm

- Auswertung: Methode des internen Standards (520)
 Peakhöhe: graphisch oder rechnerge-
 steuert (521)
 Fläche über elektronische Integration
- Ergebnisse: Peakhöhe: 1.198 ug 99.8 % des Sollwertes
 $\delta_{\text{rel}} = 2.11 \% (n = 8)$
 Fläche: 1.212 ug 101.0 % des Sollwertes
 $\delta_{\text{rel}} = 1.45 \% (n = 9)$
- Erfassungsgrenze: ca. 0.5 $\mu\text{g}/\text{Fleck}$
- Nachweisgrenze: ca. 0.2 $\mu\text{g}/\text{Fleck}$

4.2.1.3.0. Gaschromatographische Untersuchungen

- A. Gerät: PERKIN-ELMER-MULTIFRACT F 40 mit FID, OT
 250⁰ C, ET 300⁰ C; Säule: 2 m Glas, 2 mm ID, 4 %
 OV-17 auf Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh),
 Trägergas: P_{N₂} 1,5 atü, ca. 32 ml min⁻¹.

Substanz	Nettoretentionszeit	Retentionsindex
Nefopam	290 sec	2450
Diphenhydramin	153 sec	2200
Codein	966 sec	2890

- B. Gerät: VARIAN AEROGRAH SERIES 2100 mit FID, OT
 220⁰ C, ET 250⁰ C; Säule: 1,5 m Glas, 2 mm ID,
 3 % OV-17 auf Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh),

Trägergas: P_{N_2} 1 atü, ca. 50 ml min⁻¹.

Nefopam	223 sec	2410
Nor-Nefopam	243 sec	2440

bzw.

Säule: 1,5 m Glas, 2 mm ID, 3 % SE-30 auf Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh), Trägergas N_2 (30 ml min⁻¹).

Nefopam	91 sec	2050
Nor-Nefopam	88 sec	2040

Zur Berechnung der Retentionsindizes vgl. Kap. 3.1.1.2.4.

4.2.1.4.0. Spektroskopische Untersuchungen

4.2.1.4.1. UV-Spektren

In EtOH abs.: Maxima bei 267 und 274 nm, Minima bei 243 und 272 nm.

In n/10 HCl: Spektrum praktisch identisch mit Äthanol-spektrum.

In n/10 NaOH: Relativ unspezifisches UV-Spektrum, Schulter im Bereich von 260 - 270 nm.

(vgl. Abb. 16 auf S.121)

4.2.1.4.2. IR-Spektren

In Abb. 17a auf S.122 ist das Spektrum des Hydrochlorids (= AJAN^R), in Abb. 17b das der freien Base wiedergegeben.

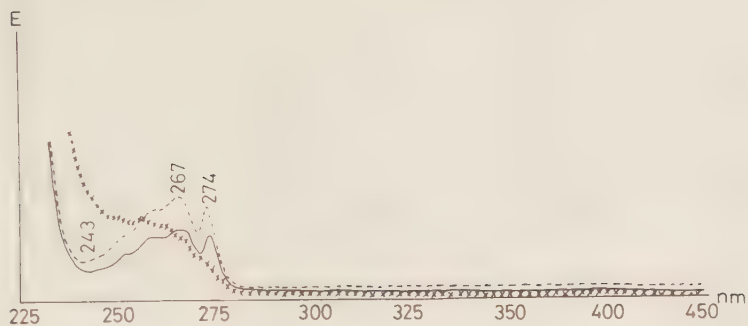


Abb. 16: UV-Spektren von Nefopam.

Gemessen wurde in drei Medien:

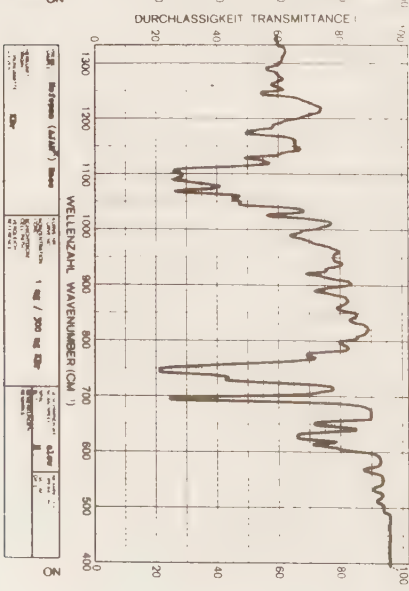
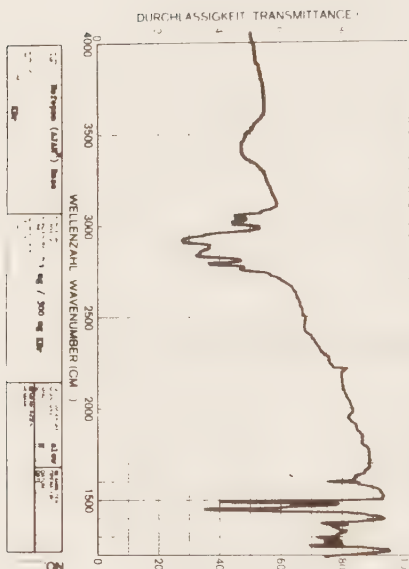
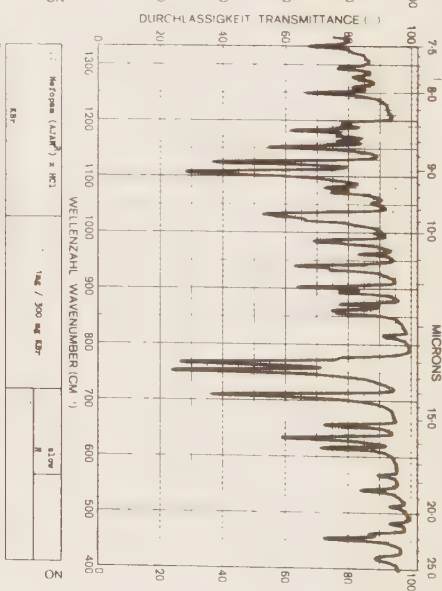
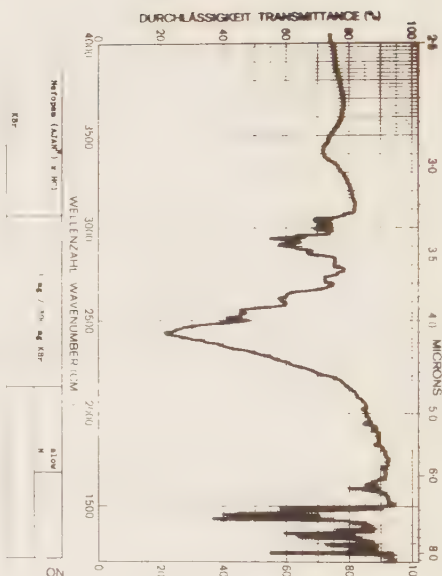
———— = abs. Äthanol,

----- = n/10 HCl,

xxxxxxx = n/10 NaOH,

Eichung mit Holmium,

Gerät: UNICAM S.P. 800



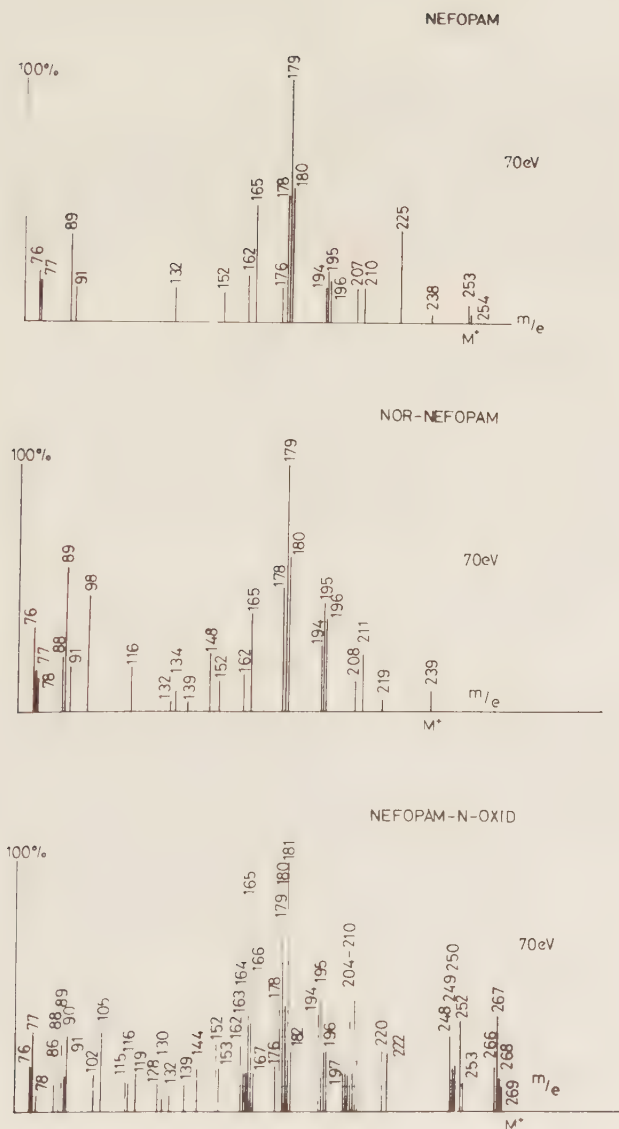


Abb.18: Massenspektren von Nefopam, Nor-Nefopam, und Nefopam-N-Oxid (70 eV, Direkteinlaß), Spektrum von Nefopam-N-Oxid nach GC/MS.

4.2.1.4.3. Massenspektren (vgl. Abb. 18 auf S.123)

Quantitative Bestimmung

Gehaltsbestimmung in pharmazeutischen Zubereitungen, Asservaten (z.B. Mageninhalt oder Trinkgefäßreste): z.B. UV-photometrisch. Die spezifische Extinktion des Hydrochlorids in abs. Äthanol wurde wie folgt bestimmt:

$$\lambda_{\max} = 267 \text{ nm} \qquad E_1^{1\text{cm}} = 22.$$

Größere Substanzmengen lassen sich auch titrimetrisch bestimmen (z.B. 0.1N HClO₄/HAc; Verdrängungstitration im Zweiphasensystem H₂O/C₂H₅OH/CHCl₃ mit 0.1N NaOH).

4.2.1.5.0. Untersuchungen zur Biotransformation

Nach einer einmaligen Einnahme von 2 Filmtabletten AJAN^R, entsprechend 60 mg Nefopamhydrochlorid bzw. einer vom Hersteller angegebenen Normaldosierung, wurden die einzelnen Harnproben sofort tiefgefroren und später zur Erhöhung der Metabolitenausbeute gepoolt. Es zeigte sich in Vorversuchen, daß 3 Tage nach einer Einnahme im oben genannten Umfang keine wesentlichen Mengen an Nefopam bzw. dessen Metaboliten renal ausgeschieden werden. Daher wurde die Sammlung der Harnproben nach dieser Zeitspanne abgebrochen, zumal es uns weniger darum ging, pharmakokinetische Daten zu ermitteln als zunächst die Analytik und Biotransformation abzuklären.

4.2.1.5.1. Extraktionsgang

Die Urinproben wurden bei pH 2 mit Diäthyläther extrahiert, um so evtl. durch oxydative Ringöffnung entstandene saure Metaboliten zu isolieren. Mittels UV-photometrischer und dünnschichtchromatographischer screening-tests ergaben sich jedoch keinerlei Anhaltspunkte für diesbezügliche Metabolisierungsschritte.

Zur Extraktion von Nefopam und Nor-Nefopam erwies sich aufgrund umfangreicher Vorversuche eine Ausschüttelung mit Cyclohexan bei pH 11 als am geeignetsten. Hierfür sprechen hauptsächlich drei Gründe:

1. Mit Cyclohexan konnten bereits mit einer einzigen Extraktion (5 min manuell, danach noch 20 Minuten in der Schüttelmaschine) über 90 % des Anteils an Nefopam und Nor-Nefopam in die organische Phase überführt werden.
2. Mit Cyclohexan erhält man sehr reine Extrakte, da zahlreiche polarere Basen (z.B. Coffein, Pyrazolone u.v.a.) mit Cyclohexan nicht oder in nicht nennenswertem Umfang extrahiert werden. Letztere lassen sich, falls erwünscht, in einem weiteren Extraktionsgang ebenfalls bei pH 11 z.B. mit Essigsäureäthylester isolieren.
3. Nefopam und Nor-Nefopam lassen sich wiederum aus der Cyclohexanphase z.B. zur Durchführung von UV-photometrischen Messungen in nahezu quantitativer Ausbeute mit Zn-Salzsäure ausschütteln.

Um feststellen zu können, ob der Harn unkonjugierte extrahierbare phenolische Metaboliten enthält, wurde nach der Basenisolierung mit Cyclohexan bei pH 8,5 bis 9,0 mit Chloroform / iso-Propanol (4+1), einem insbesondere auch aus der Morphinanalytik bekannten Extraktionsmittel für Phenolbasen, ausgeschüttelt. Entsprechende weiterführende Untersuchungen lieferten jedoch keine Hinweise auf unkonjugierte Phenolbasen.

Zur Konjugatsspaltung wurde bei pH 5,5 mit Arylsulfatase / β -Glucuronidase (Präparat der Fa. Merck / L'industrie biologique française S.A., Gennevilliers (Seine)) bis zu einer Konzentration von 0,5 - 1,0 Vol% versetzt und 18 Stunden bei 36° C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine erneute Basenextraktion mit Cyclohexan bei pH 11.

Mit Hilfe einer weiteren Phenolbasenisolierung mittels Chloroform / iso-Propanol (4+1) bei pH 9 und anschließender dünnschichtchromatographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß mindestens 4 Komponenten mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagens anfärben waren, die erst bei der Enzymhydrolyse freigesetzt wurden. Hiervon überwog der Anteil einer Komponenten jedoch wesentlich die Gesamtmenge der restlichen Phenolbasen.

Bei den Untersuchungen konnte weiterhin die Existenz von Nefopam-N-Oxid sichergestellt werden,

das höchstwahrscheinlich ebenfalls als Biotransformationsprodukt anzusehen sein dürfte. Die letztgenannte Substanz bildet sich jedoch auch aus Nefopam insbesondere auf der Dünnschichtplatte im Zustand des Chemisorpt (vgl. hierzu auch (4, 5, 45)).

4.2.1.5.2. Identifizierung

Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte mit Hilfe dünnsschichtchromatographischer, gaschromatographischer, UV-photometrischer, IR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Untersuchungen.

Wichtige analytische Daten der Metaboliten sollen nachstehend mitgeteilt werden:

- a) UV-Spektren: Die UV-Spektren von Nor-Nefopam stimmen mit denen von Nefopam praktisch überein (in Äthanol Maxima bei 267 und 274 nm, Minima bei 243 und 272 nm; Spektrum in n/10 HCl wie Äthanol; in n/10 NaOH relativ unspezifisches Spektrum, Schulter im Bereich von 260 - 270 nm).

Vgl. auch Abb. 16 in Kap. 4.2.1.4.1.

Nefopam-N-Oxid: In Äthanol Maxima bei 268, 276 und 283 nm.

Zum IR-Spektrum von Nefopam vgl. Abb. 17 a) und b)

- b) Massenspektren: In Abb. 18 a - c auf S. 123 sind die Massenspektren von Nefopam, Nor-Nefopam und Nefopam-N-Oxid wiedergegeben. Leicht interpretierbare Peaks entsprechen den m/e -Werten:

M - 15 = 238 (Demethylierung von Nefopam zu Nor-Nefopam)

M - 28 = 225 bei Nefopam bzw. 211 bei Nor-Nefopam, entsprechend einer CO-Abspaltung cyclischer Äther

Die in allen 3 Spektren enthaltenen Hauptpeaks im Bereich um $m/e = 179$ sind auf Diphenylmethylfragmente nach einem weitestgehenden Abbau des 2,5-Benzoxazozingerüstes zurückzuführen. Typisch für phenylsubstituierte Verbindungen ist auch das Auftreten von $m/e = 91$ (Tropylium-Kation) sowie $m/e = 76$ und 77 (vgl. auch (109)).

- c) Dünnschichtchromatographie: (zur Trennung des Nefopam von zahlreichen anderen starken Analgetika vgl. Kap. 4.2.1.2.1. (Tabelle a))

Als günstiges System für die dünnschichtchromatographische Unterscheidung der Metaboliten erwies sich auf Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) das Fließmittelgemisch Benzol / i-Propanol / 25% Ammoniak (80 + 20 + 1; v/v/v).

R_f-Werte: (Anfärbemöglichkeit mit Jodoplateat oder DRAGENDORFF-Reagens).

Nefopam (xHCl = AJAN ^R)	0,63
Nor-Nefopam	0,48
Nefopam-N-Oxid	0,06
phenolische Hauptkomponente	0,42
Codein (Vergleichssubstanz)	0,30
Diphenhydramin (Vergleichssubst.)	0,72

(Aufsteigende Methode, Kammersättigung, keine besondere Aktivierung)

d) Gaschromatographie: (vgl. auch Kap. 4.2.1.3.0.)

Die beiden Nebenmetaboliten (Nefopam-N-Oxid bzw. die phenolische Hauptkomponente nach Fermenthydrolyse) unterliegen bei der gaschromatographischen Trennung offenbar einer thermischen Zersetzung oder Umlagerung.

Die Trennung von Nefopam und Nor-Nefopam gelingt dagegen beispielsweise leicht unter folgenden Bedingungen:

Gerät: VARIAN AEROGRAPH SERIES 2100 mit FID, OT 220° C, ET 250° C; Säule: 1,5 m Glas, 2 mm ID, 3 % OV-17 auf Chromosorb G, AW/DMCS (80/100 mesh), Trägergas: P_{N₂} = 1 atü (ca. 50 ml min⁻¹).

Ergebnisse:

<u>Substanz</u>	<u>Nettoretentionszeit</u>	<u>Retentionsindex</u>
Nefopam	223 sec	2410
Nor-Nefopam	243 sec	2440

Die Berechnung der Retentionsindizes erfolgte wiederum nach (515) bzw. (516).

4.2.1.5.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse können demnach folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Nach einer oralen Einnahme therapeutischer Dosen von AJAN^R (= Nefopamhydrochlorid) konnte lediglich ein geringer Anteil (ca. 5 %) unverändertes Nefopam im Harn nachgewiesen werden.
2. Hauptmetabolit ist nach den vorliegenden Untersuchungen die Nor-Verbindung. Die Identifizierung gelang insbesondere auch mit Hilfe der IR-Spektren.
3. Im Extrakt der Phenolbasen nach enzymatischer Hydrolyse sind mindestens 4 mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagens anfärbbare Substanzen nachweisbar. Hierbei überwiegt eine Komponente deutlich.

4. In den Extrakten konnten weiterhin geringe Mengen von Nefopam-N-Oxid festgestellt werden.
5. 36 Stunden nach der Einnahme von 60 mg AJAN^R konnten im Morgenurin weder Nefopam noch Nor-Nefopam mit Hilfe UV-photometrischer oder chromatographischer Methoden nachgewiesen werden.

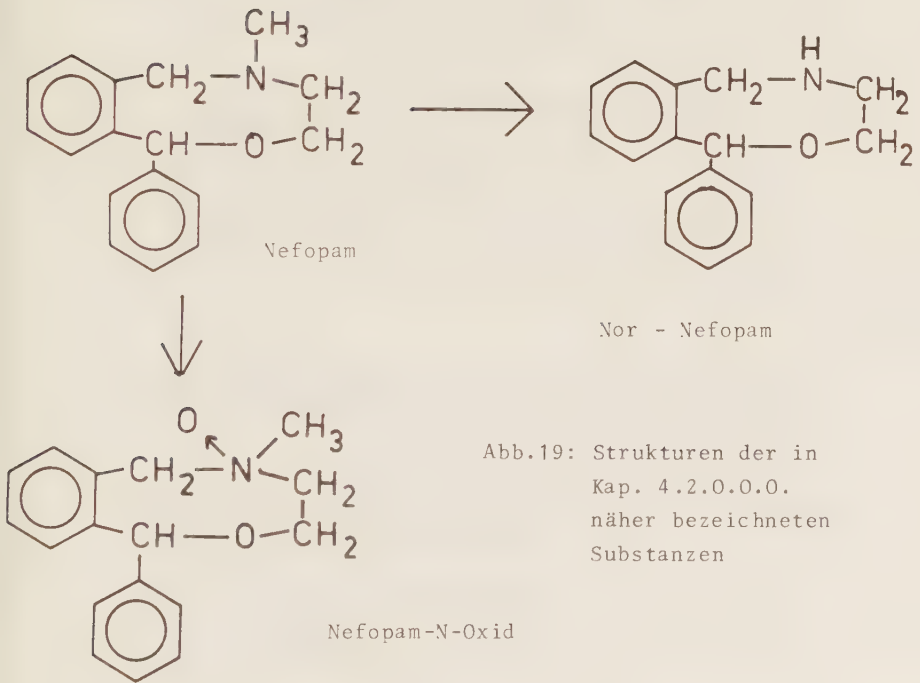


Abb.19: Strukturen der in
Kap. 4.2.0.0.0.
näher bezeichneten
Substanzen

4.2.2.0.0. Bildung von Nefopam-N-Oxid auf der Platte

4.2.2.1.0. Praktische Durchführung

0,3 ml einer Lösung von 5 mg Nefopam in 1 ml Äthanol (d.h. 1,5 mg Nefopam) werden mit einer 100 μ l-Spritze (Hamilton) bandförmig auf der Startlinie eines präparativen Dünnschichtchromatogrammes aufgetragen. Noch vor dem Verdunsten des Lösungsmittels werden ebenfalls aus einer 100 μ l-Spritze 3 x 0,1 ml einer 5 %igen Lösung von m-Chlorperbenzoesäure in Äthanol (Art. 810156 MERCK-SCHUCHARDT) über die Nefopam-Zone gegeben (CHROMATOCHARGER von CAMAG).

Das Chromatogramm wird anschließend mit einer Glasplatte bedeckt und etwa 10 min im Trockenschrank bei 100⁰ C erwärmt. Nach dem Herausnehmen und Abkühlen erfolgt die dünn-schichtchromatographische Trennung in der aufsteigenden Technik mit Essigsäureäthylester / Methanol / Ammoniak 25 % (85 + 10 + 5; v/v/v).

Nach einer Laufstrecke von ca. 15 cm können die einzelnen Zonen des Chromatogrammes wie folgt zugeordnet werden:

$R_f = 0$ - 0,05 unumgesetzte m-Chlorperbenzoesäure sowie m-Chlorbenzoesäure,

$R_f = 0,15$ - 0,25 Nefopam-N-Oxid,

$R_f = 0,70$ - 0,80 unumgesetztes Nefopam.

Die Sektoren werden in der gewohnten Weise ausgeschabt und mit Äthanol eluiert.

4.2.2.2.0. Ergebnisse

Grundsätzlich kann Nefopam auch mit Wasserstoffperoxid in das N-Oxid überführt werden. Bei diesbezüglichen Versuchen erfolgte jedoch stets nur ein teilweiser Umsatz. Eine fast 100 %ige Ausbeute konnte dagegen in der oben geschilderten Weise mittels m-Chlorperbenzoesäure als hochspezifischem Oxidationsmittel (vgl. auch (522, 523, 524, 525, 526)) erzielt werden.

Zu Vergleichszwecken wurde Nefopam-N-Oxid auch als Lösungsreaktion präpariert. Als Nachteile waren dabei jedoch festzustellen:

- a) Deutlich verlangsamte Umsetzung, d.h. größerer Zeitbedarf.
- b) Verglichen mit der Reaktion auf der DC-Platte wesentlich geringere Ausbeute; zahlreiche Nebenprodukte.
- c) Verluste beim Reinigen (Extrahieren, Umkristallisieren).

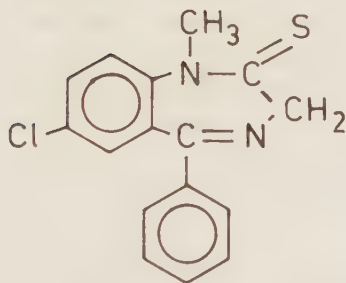
Das nach der Reaktion auf der DC-Platte gewonnene N-Oxid war praktisch spektralrein, wenn die präparative Dünnschichtplatte vor dem Einsatz über die gesamte Plattenfläche zweimal mit Dichlormethan / Methanol (80 + 20; v/v) entwickelt wurde. Diese Reinigungsoperation muß jedoch unmittelbar v o r der Reaktion erfolgen, da die DC-Platte sonst wieder Verunreinigungen aus der Laborluft adsorbiert (vgl. hierzu auch (527)).

4.2.3.0.0. Versuche zur photolytischen Desalkylierung von Nefopam

Zahlreiche Versuche, auch Nefopam durch photolytische Desalkylierung (vgl. Kap. 3.1.2.0.0.) in den Hauptmetaboliten Nor-Nefopam zur überführen, erbrachten nicht das erhoffte Ergebnis. Bereits bei der photolytischen Desalkylierung hydrolysierter N-1-alkylierten Benzodiazepine konnte beobachtet werden, daß die Reaktion nur dann glatt und mit hoher Ausbeute abläuft, wenn das nachbarständige C-Atom (= C-2 nach der Benzodiazepinring-Nomenklatur) mit einem elektronegativeren Substituenten (z.B. Carbonylsauerstoff) versehen ist, wie dies auch bei den Benzodiazepinen Diazepam, Flurazepam, Prazepam und Flunitrazepam der Fall ist. Medazepam, das am C-2-Atom lediglich hydriert ist, war einer photolytischen Desalkylierung nicht zugänglich.

Eine Interpretationsmöglichkeit für den dargelegten Sachverhalt könnte darin gesehen werden, daß der elektronegative Substituent am Nachbaratom durch einen negativen induktiven (-I)-Effekt die Bindung zwischen dem N-1-Stickstoff und dem Alkylkohlenstoff bereits lockert, so daß die Photolyse leichter vonstatten geht.

Desalkylierungsversuche mit Sulazepam



das strukturchemisch als Thioanaloges von Diazepam in Bezug uf die Substitution am C-2-Atom aufzufassen ist (die beiden Benzodiazepine unterscheiden sich lediglich an dieser Stelle des Moleküls) hatten zum Ergebnis, daß auch hier eine photolytische Desalkylierung möglich war. Offensichtlich ist somit bereits die Elektronegativität des Schwefels für eine entsprechende Reaktionsbeeinflussung ausreichend.

4.3.0.0.0. Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam

4.3.1.0.0. Zur Biotransformation von Flunitrazepam

Nach Cano et al. (351) ist bei der Biotransformation von Flunitrazepam das in Abb. 20 wiedergegebene Schema gültig, das in vielen Einzelheiten Analogien zum Stoffwechsel von Clonazepam bzw. Nitrazepam aufweist (vgl. hierzu Kap. 3.2.2.3.0. bzw. Abb. 8).

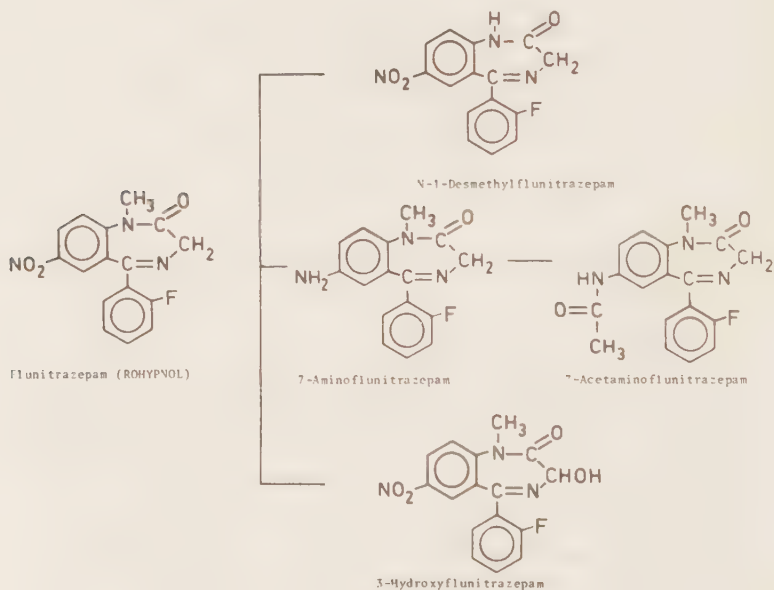


Abb. 20: Biotransformation von Flunitrazepam (ROHYPNOL)

Hauptmetabolisierungsschritte sind wiederum:

1. Desalkylierung in N-1-Stellung
2. Reduktion der 7-Nitrogruppe mit anschließender Acetylierung
3. Hydroxylierung in 3-Stellung, (incl. Konjugatbildung).

Flunitrazepam wird, wie alle anderen in 7-Position nitrosubstituierten Benzodiazepine, praktisch quantitativ metabolisiert, d.h. renal werden allenfalls Spuren des unveränderten Pharmakons ausgeschieden. Bei der Aufarbeitung biologischen Materials ist somit nahezu ausschließlich mit der Gewinnung von Stoffwechselprodukten zu rechnen. Die analytische Erfassung dieser Derivate steht daher im Rahmen der chemisch-toxikologischen Analyse im Vordergrund.

Nachstehend soll auf Synthesemöglichkeiten für alle Metaboliten ausführlich eingegangen werden. Neben der Präparation auf der DC-Platte wird stets auch noch eine Synthese nach konventionellen Methoden als Lösungsreaktion behandelt und mit der DC-Synthese verglichen.

4.3.1.1.0. Konventionelle Synthese von 7-Aminoflunitrazepam (= 7-Amino-(o-fluorphenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on)

Eine Lösung von 50 mg Flunitrazepam in 3 ml 50%igen Äthanol wird durch Zugabe von 100 mg MgO alkalisiert und zur Reduktion mit 200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ versetzt. Die Suspension wird kräftig gerührt und etwa 1 Stunde auf dem Wasserbad (50°C) erwärmt. Nach dem Abkühlen erfolgt zunächst die Abtrennung der Hauptmenge an Lösungsmittel durch Destillieren im Vakuumrotationsverdampfer. Die verbliebene wäßrige Phase wird mit Methylenchlorid / Essigsäureäthylester (2+1) ausgeschüttelt. Anschließend engt man den abgetrennten organischen Extrakt im Rotationsverdampfer ein und kristallisiert um (Äthanol). Gelbliche Kristalle; Fp $208-212^\circ\text{C}$. MG = 283,3 .

4.3.1.2.0. Konventionelle Synthese von 7-Acetamidoflunitrazepam (= 7-Acetamido-(o-fluorphenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on)

Eine Lösung von 30 mg 7-Aminoflunitrazepam in 0,5 g Acetanhydrid wird etwa 5 Minuten auf 50 - 60°C erwärmt und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach etwa 1 Stunde wird das Reaktionsprodukt abfiltriert und mit Diäthyläther gewaschen. Umkristallisieren aus Xylol / DMF (9+1) ergibt farblose bis schwach gelbliche Kristalle (Fp ca. 260°C, Zers.)
MG = 325,35 .

4.3.2.1.0. Darstellung von 7-Aminoflunitrazepam auf der DC-Platte

Auf der Startlinie einer üblichen DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), z.B. Art.Nr. 5715 MERCK), ohne besondere Aktivierung, werden 1 - 2 mg Flunitrazepam durch Auftragen einer verdünnten Lösung (in 1 ml Essigsäure-äthylester) mit Hilfe eines Chromatochargers oder ähnlichen Gerätes aufgebracht. Nach dem Verflüchtigen des Lösungsmittels wird die DC-Platte mit Hilfe von Streifen so abgedeckt, daß lediglich die Auftragezone frei liegt. Anschließend erfolgt das Aufsprühen des Reagenzes (Titan(III)-chloridlösung, Art.Nr. 808307 MERCK) in der mittels Abb. 21 dargestellten Weise. Die Lösung soll die Sorbensschicht voll durchdringen, durch Betrachten der Platte von der Rückseite kann bequem kontrolliert werden, ob dieser für einen möglichst quantitativen Umsatz erforderliche Zustand erreicht ist.

Die DC-Platte wird nun mit warmer (keineswegs heißer) Luft so lange getrocknet, bis die graublaue Färbung des Titan(III)-chloridsprays verschwindet. Bei höheren Temperaturen muß mit einer Hydrolyse zu Aminobenzophenonen gerechnet werden, da die wäßrige Titan(III)-chloridlösung infolge Hydrolyse stark sauer reagiert. Aus diesem Grund liegen die bei der Reduktion

entstandenen Amine als Hydrochloride vor und müssen vor der nachfolgenden dünn-schichtchromatographischen Trennung bzw. Reinigung in die entsprechenden Basen überführt werden, da nur in dieser Form ein befriedigendes chromatographisches Trennverhalten gegeben ist. Dies geschieht durch etwa 5 minütiges Einstellen der Platte in eine geschlossene Glaskammer (leerer Chromatographie-tank), die Ammoniakdämpfe enthält (Becherglas mit etwas Ammoniak 25% auf dem Boden der Kammer).

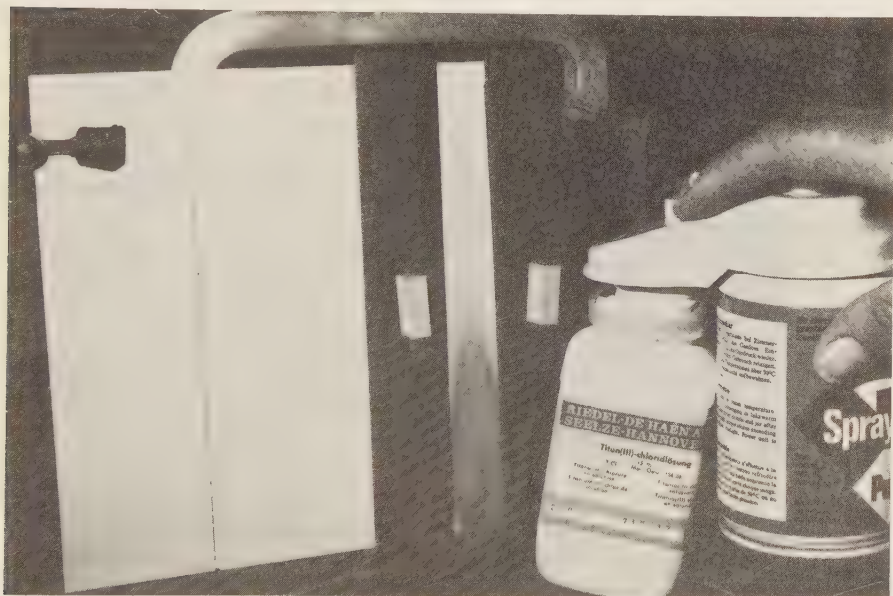


Abb. 21: Aufsprühen der Titan(III)-lösung auf die Startlinie (Einzelheiten s.Text)

Zur Entwicklung der Platte eignet sich insbesondere das Fließmittel Essigsäureäthylester / Methanol / Ammoniak konz. (85 + 10 + 5; v/v/v), da sich mit diesem Gemisch einerseits außergewöhnlich scharfe Substanzzonen auch bei höheren R_f -Werten bilden und andererseits evtl. noch vorhandene Hydrochloridreste durch den Ammoniakanteil quantitativ in die entsprechenden Basen überführt werden. 7-Aminoflunitrazepam kann im R_f -Wert-Bereich 0,85 mit Hilfe der Fluoreszenzlöschung indiziert werden. Anschließend schabt man die entsprechende Zone des Chromatogrammes aus und saugt den mit 7-Aminoflunitrazepam versetzten Kieselgelanteil in einer Mikrofritte wiederholt mit Essigsäureäthylester ab. Nach dem Einengen des Extraktes im Vakuumrotationsverdampfer sollte die Substanz möglichst rasch chromatographisch bzw. spektroskopisch untersucht werden, da sie als primäres Amin leicht den gewohnten Umwandlungen und Zersetzungen unterliegt.

Beim Einsatz von Diäthyläther als Elutionsmittel ist unbedingt zu berücksichtigen, daß auch die handelsüblichen p.a.-Reinheitsgrade vielfach mit Jonol (typische m/e Werte: 205 = M^+ - 15; 57 = $(CH_3)_3C^+$) zur Stabilisierung versetzt sind.

4.3.2.2.0. Darstellung von 7-Acetamidoflunitrazepam auf der DC-Platte

7-Acetamidoflunitrazepam bildet sich auf der DC-Platte mit nahezu 100%iger Ausbeute, wenn man das Chromatogramm, auf dessen Startlinie sich 7-Aminoflunitrazepam befindet (Darstellung s.u. 4.3.2.1.0.), nach Freisetzen der Base aus evtl. Salzverbindungen mit dem Fließmittel Essigsäureäthylester / Essigsäureanhydrid (95 + 5; v/v) entwickelt. Die Elution (R_f -Wert-Bereich 0,20 - 0,30) erfolgt in der oben (Kap. 4.3.2.1.0.) näher beschriebenen Weise. Insbesondere vor dem Messen der Spektren muß die Acetamidoverbindung gründlich von allen Lösungsmittelresten (Schwerflüchtigkeit

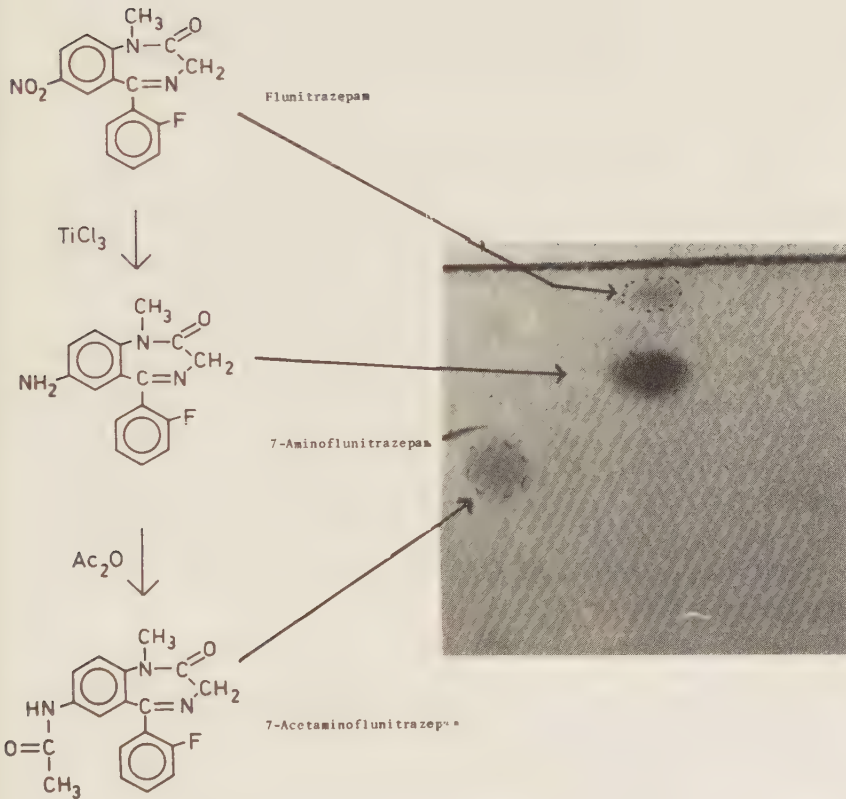


Abb. 22: Ausschnitt eines Dünnschichtchromatogrammes zur Überprüfung der Reinheit und Ausbeute auf der DC-Platte hergestellten 7-Amino- bzw. 7-Acetamidoflunitrazepams (näheres s. Text)

von Essigsäureanhydrid) befreit werden. In Abb. 22 (Seite 141) ist eine dünnschichtchromatographische Trennung und Reinheitsprüfung der entstandenen Produkte dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß 7-Amino-flunitrazepam praktisch quantitativ zu 7-Acetamidoflunitrazepam umgesetzt wurde.

4.3.3.0.0. Ergebnisse, Vergleich und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß sich 7-Aminoflunitrazepam und 7-Acetamidoflunitrazepam in nahezu quantitativer Ausbeute mit Hilfe von Reaktionen a u f der DC-Platte darstellen lassen. Hierbei entfallen zeitraubende Zwischenextraktionen und Reinigungsschritte. Außerdem tritt bei der Synthese auf der Platte die sonst im sauren Reaktionsmedium stark ausgeprägte Hydrolyse zu den Aminobenzophenonderivaten in den Hintergrund. Dies dürfte nicht zuletzt auch darauf zurückzuführen sein, daß sich der Reaktionsablauf auf der Platte praktisch bei Zimmertemperatur abspielt, was wiederum als Indiz für die erhöhte Reaktionsfähigkeit vieler Substanzen im adsorbierten Zustand auf der Platte anzusehen sein dürfte.

Alle Spektren sind in Kap. 4.6.0.0.0. abgebildet.

4.4.0.0.0. Darstellung von N-1-Desalkylflunitrazepam (Nor-Flunitrazepam)

4.4.1.0.0. Allgemeine Ausführungen

Während Desalkylierungsreaktionen in vivo eine große Rolle spielen, da Fremdstoffe (z.B. Pharmaka) auf diese Weise polarer und damit renal leichter exkretierbar werden, existieren so gut wie keine einfach und mit höherer Ausbeute durchführbaren präparativen Methoden zur Abspaltung von N-Alkylgruppen. Alkylierungsverfahren (z.B. mit Dialkylsulfat oder Diazomethan) sind dagegen vielfältig bekannt und in Anwendung.

Bereits im Rahmen qualitativer Untersuchungen (vgl. Kap. 3.1.2.0.0.) konnte nachgewiesen werden, daß Desalkylierungsreaktionen auf photochemischem Weg möglich sind. Durch eine Optimierung des Verfahrens (vgl. nachstehende Ausführungen) gelang es auch, photolytische Desalkylierungsreaktionen in befriedigender Ausbeute für präparative Zwecke im Milligramm-Maßstab einzusetzen. Es muß allerdings ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die Ausbeuten (nahezu 100 %), der in Kap. 4.3.0.0.0. beschriebenen Reaktionen bei der präparativen Gewinnung der Nor-Verbindungen nicht erreicht wurden. Nach umfangreicher Ausarbeitung der nachstehend beschriebenen Technik lagen die Reaktionsausbeuten bei ca. 50 %. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß sich, wie dargelegt, Nor-Verbindungen mittels konventioneller chemischer Methoden sonst nur durch eine komplette Synthese mit entsprechenden desalkylierten Ausgangsverbindungen erhalten lassen, erschien jedoch auch die Erarbeitung einer Methode mit geringeren Ausbeuten interessant und vertretbar.

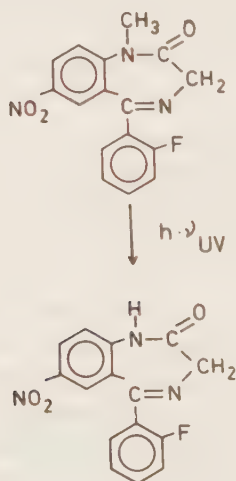
4.4.2.0.0. Versuche zur photolytischen Desalkylierung als Lösungsreaktion

Bestrahlungsversuche in Quarzküvetten ergaben trotz Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel und Konzentrationen keine Hinweise auf das Entstehen erwähnenswerter Mengen an Nor-Verbindungen, obwohl sich insbesondere bei langen Belichtungszeiten außerordentlich viele andere Substanzen bildeten. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte darin gesehen werden, daß es sich bei der photolytischen N-Desalkylierung offensichtlich um eine Reaktion handelt, die bereits durch Hydratation bzw. Solvatation unterbunden wird. Bei der DC-Synthese ist ferner zu beachten, daß eine Desalkylierung nur bei denjenigen Molekülen stattfindet, die sich unmittelbar auf

der Sorbensoberfläche befanden. Wurde eine DC-Platte nämlich nach Bestrahlung mit UV-Licht nochmals mit einem geeigneten Fließmittel entwickelt, so traten aus tieferen Schichten des Sorbens offensichtlich noch nicht desalkylierte Substanzanteile an die Oberfläche, die bei einer nachfolgenden Bestrahlung wiederum primäre aromatische Amine (Nachweis mit Hilfe der Reaktion nach Bratton-Marshall lieferten. Vermutlich wird durch Remission (diffuse Reflexion) bzw. Absorption der UV-Strahlung durch das Kieselgel eine quantitative Umsetzung verhindert.

Eine Optimierung der Methode mußte demnach das Ziel verfolgen, mit Hilfe einer geeigneten Technik möglichst hohe Substanzanteile an die Oberfläche der DC-Platte zu bringen.

4.4.3.0.0. Photolytische Desalkylierung von Flunitrazepam unter präparativen Aspekten auf der DC-Platte



In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß sowohl aufgesprühte als auch mit dem Chromatocharger aufgetragene Substanzlösungen tief in die Sorbensschicht eindringen und so der Einwirkung der UV-Strahlung entzogen wurden. Mit Hilfe der nachstehend beschriebenen Technik gelang es, die zu desalkylierende Substanz im wesentlichen auf der Plattenoberfläche zu konzentrieren: Hierzu legt man eine präparative Dünnschichtplatte (z.B. Art.Nr. 5717 MERCK) in Aceton oder Essigsäureäthylester, bis sie ein Maximum an Lösungsmittel aufgesaugt hat. Unmittelbar danach wird die noch tropfnasse Platte mit der Lösung des zu desalkylierenden Benzodiazepins besprüht. Hierbei dringen allenfalls unwesentliche Substanzmengen in das Sorbensinnere, da dieses bereits mit Lösungsmitteln abgesättigt ist. Beim anschließenden Ablüften der Platte mit Warmluft treten die im unteren Teil der Trägerschicht enthaltenen Lösungsmittelanteile wieder an die Oberfläche wobei Substanzreste, die vorher geringfügig in die Schicht diffundierten, wiederum an die Plattenoberfläche gelangen. Auf diese Weise wird erreicht, daß wesentlich höhere Anteile der Probesubstanz bei der UV-Bestrahlung exponiert sind.

Eine Belichtung der Platte darf erst nach dem Verflüchtigen aller Lösungsmittelreste erfolgen. Auch bei den präparativen Untersuchungen konnte bei Belichtungszeiten über 30 Minuten keine Steigerung der Ausbeute mehr festgestellt werden. Die Anzahl der Nebenprodukte nahm bei längeren Exponierungen beträchtlich zu (vgl. hierzu auch Kap. 3.1.2.3.1).

Der Abstand zwischen Strahlungsquelle und DC-Platte betrug etwa 40 cm. Die Platte wurde unter dem Abzug (Ozonbildung) mit Hilfe einer Stativklammer fixiert, (vgl. Abb. 23). Als Strahler wurden sowohl kommerzielle Geräte für Photoreaktionen (z.B. TQ 150, Hanau) als auch eine Höhensonne (allerdings ohne zusätzliche zwangsweise IR-Strahlung, wie sie neuerdings zur Vermeidung von UV-Überdosierungen vorgeschrieben ist) eingesetzt.

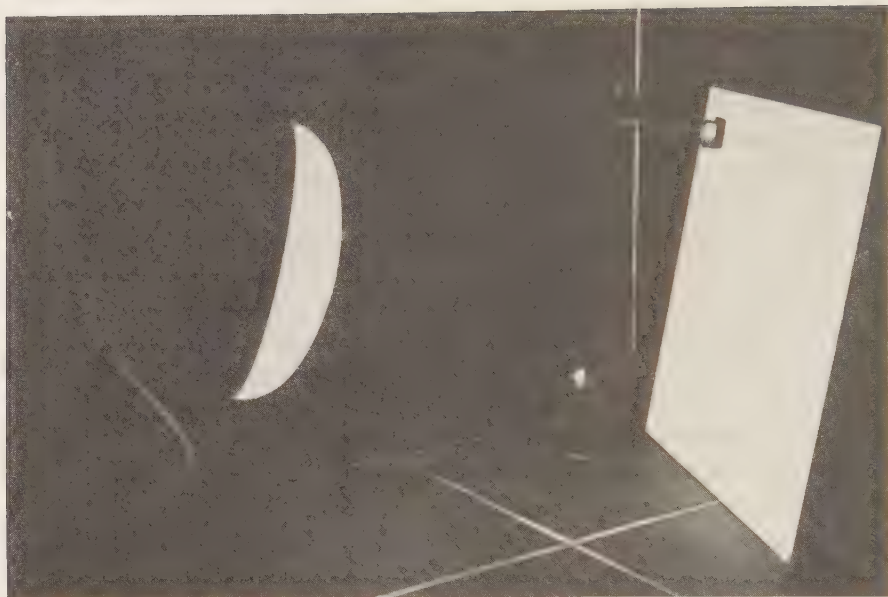


Abb. 23: Anordnung zur Bestrahlung der DC-Platte mit UV,
(Einzelheiten vgl. Text)

Nach der Bestrahlung befinden sich auf der Plattenoberfläche zahlreiche Substanzen gleichmäßig verteilt (z.B. unumgesetztes Flunitrazepam, Nor-Flunitrazepam, zahlreiche Nebenprodukte). Beim Entwickeln der Platte mit einem äußerst polaren Fließmittel (z.B. Aceton) gelingt es, diese Reaktionsprodukte auf einem Streifen am oberen Ende der Platte (bei aufsteigender Technik) zu konzentrieren, da alle Derivate bei Verwendung von Aceton als Fließmittel praktisch bis zum R_f -Wert-Bereich 1,0 wandern. Zur Trennung der verschiedenen Substanzen wird die Platte nach gründlichem Ablüften um 180° gedreht und mit dem Fließmittelgemisch Benzol / Iso-Propanol / Ammoniak konz. (80 +

20 + 1; v/v/v) entwickelt. Die geschilderte Methodik ist in der nachstehenden schematischen Darstellung nochmals zusammenfassend wiedergegeben:

- a) Nach der Bestrahlung liegen die Substanzen A, B und C verteilt auf der gesamten Plattenfläche vor:

```

ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC

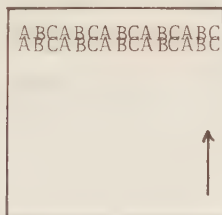
```

- b) Nach dem Entwickeln mit Aceton wurden alle Substanzen in einem Band am oberen Rand der Platte konzentriert:

```

ABCA BCABCA BCABC
ABCA BCABCA BCABC

```

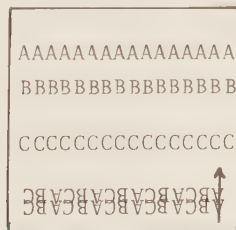


- c) Durch Drehen der Platte um 180° und Entwickeln mit Benzol / Iso-Propanol / Ammoniak konz. werden die einzelnen Komponenten getrennt.

```

AAAAAAAAAAAAAAAAA
BBBBBBBBBBBBBBBBB
CCCCCCCCCCCCCCCCC
ABCA BCABCA BCABC

```



Die einzelnen Derivate können anhand der Fluoreszenzlöschung bei folgenden R_f -Werten indiziert werden:

<u>R_f-Wert</u>	<u>Substanz</u>
0,85	Flunitrazepam
0,72	Nor-Flunitrazepam
0,62 u. 0,57	nicht näher identifizierte Nebenprodukte

Die Elution erfolgt zweckmäßigerweise mit Essigsäureäthylester (vgl. Ausführungen hierzu in Kap. 4.3.2.1.0.).

4.4.4.0.0. Ergebnisse, Vergleich und Diskussion

Aufgrund der Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß photolytische Desalkylierungsreaktionen in Lösungen nicht ohne weiteres durchführbar sind. Auf der DC-Platte konnten hingegen nach Entwicklung einer speziellen Arbeitstechnik Umsetzungen mit befriedigenden Ausbeuten erzielt werden.

Spektren sind in Kap. 4.6.0.0.0. wiedergegeben.

- 4.5.0.0.0. Darstellung von 3-Hydroxybenzodiazepinen
- 4.5.1.0.0. Bedeutung der 3-Hydroxyderivate für die
Biotransformation und Analytik der Benzodiazepine

Hydroxylierungsreaktionen stellen wichtige Biotransformationsschritte dar, da sie die Konjugatbildung (z.B. mit Schwefel- bzw. Glukuronsäure) ermöglichen. Die Beteiligung der 3-Hydroxylierung am Gesamtstoffwechselgeschehen kann dabei innerhalb extremer Werte schwanken. Während beispielsweise 3-Hydroxynitrazepam, 3-Hydroxyclonazepam und 3-Hydroxyflunitrazepam lediglich Nebenmetaboliten darstellen, da die Hauptmenge über eine Reduktion und Acetylierung der 7-Nitrogruppe verstoffwechselt wird (vgl. auch Kap. 3.2.2.3.0. bzw. Kap. 4.3.1.0.0.), kommt der Bildung von 3-Hydroxyprazepam im Verlauf der Biotransformation dieses Benzodiazepins entscheidende Bedeutung zu (80, 312). Auch im Rahmen des Diazepamstoffwechsels nimmt die 3-Hydroxylierung, allerdings nach vorheriger Desalkylierung, eine dominierende Stellung ein, (Literatur unter 3.2.1.2.3.).

Im Rahmen der Analytik der Benzodiazepinderivate spielen 3-Hydroxyderivate insofern eine besondere Rolle, als ihre Extraktion erst nach Spaltung der Konjugate mit Hilfe vorwiegend enzymatischer Hydrolysen (z.B. β -Glukuronidase / Arylsulfatase) möglich ist. Die Technik der Konjugatsspaltung wurde bereits in Kap. 3.2.2.6.0. sowie 4.2.1.5.1. ausführlich beschrieben.

In Abb. 24 ist die Biotransformation von Prazepam schematisch dargestellt.

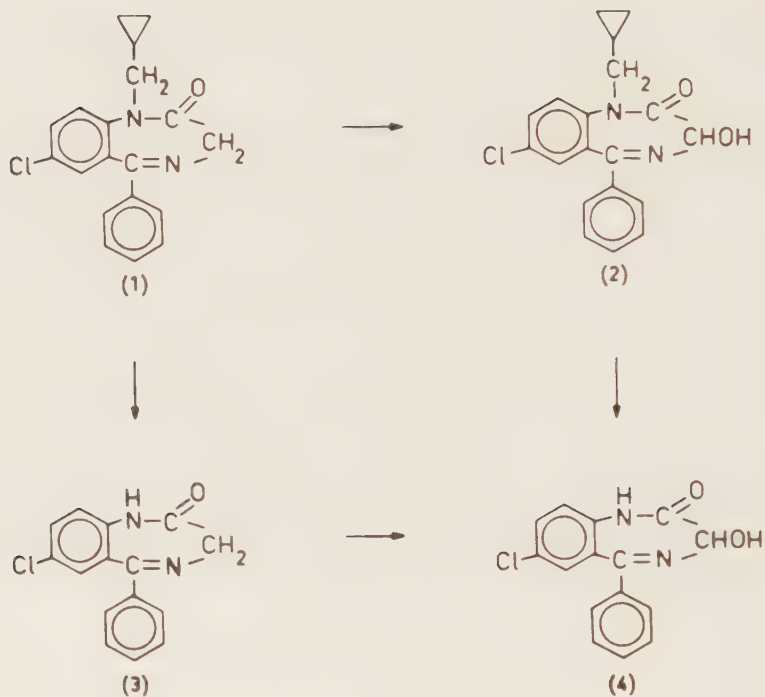


Abb. 24: Biotransformationsschema des Prazepam (1).

(2) = 3-Hydroxyprazepam; (3) = Nor-Prazepam;

(4) = 3-Hydroxy-Nor-Prazepam = Oxazepam.

4.5.2.0.0. Überblick über Synthesemöglichkeiten

Nach Bell u. Childress (533 - 535) werden 3-Hydroxybenzodiazepine im Sinne einer Polonovski-Reaktion (529, 530, 532) aus den N-Oxiden durch Umsetzung mit Acetanhydrid und anschließender Hydrolyse dargestellt (vgl. Abb. 25).

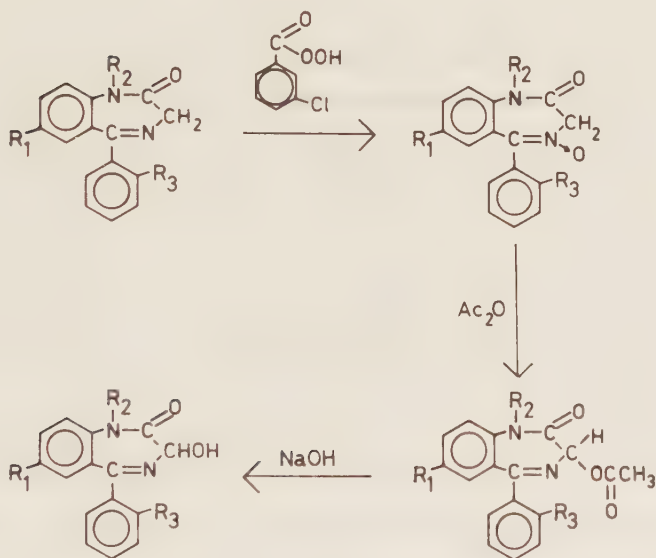


Abb. 25: Darstellung von 3-Hydroxybenzodiazepinen.

4.5.2.1.0. Darstellung der N-Oxide

Vor der Einführung von m-Chlorperbenzoesäure zur selektiven N-Oxidbildung bei tertiären Aminen wurden in der Hauptsache folgende Reaktionen beschrieben:

4.5.2.1.1. Oxydation mit Wasserstoffperoxid

Beyer u. Sadée (180) berichten über schlechte Ausbeuten an Nitrazepam-N-4-Oxid bei Verwendung von Wasserstoffperoxid.

In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß vor allem zwei Hauptnachteile gegen einen Einsatz sprechen:

- a) Ein nennenswerter Reaktionsverlauf konnte, verglichen mit der Anwendung von m-Chlorperbenzoesäure, erst bei relativ hohen Temperaturen (etwa ab 60°C) beobachtet werden, wobei sich einzelne Substanzen bereits merkbar zersetzen,
- b) die Umsetzungen mit Wasserstoffperoxid verlaufen äußerst unselektiv, d.h. auch bei vergleichbaren Temperaturen traten bei Anwendung von m-Chlorperbenzoesäure viel weniger Nebenprodukte auf.

Geringe Ausbeuten beobachteten Bell et al. (533) auch beim Einsatz von 40%iger Peressigsäure in Essigsäure.

4.5.2.1.2. Bildung aus Chinazolin-N-3-Oxid unter Ringerweiterung

Diese Variante wird von Sternbach et al. (536) sowie Beyer u. Sadée (180) beschrieben. Hohe Ausbeuten konnten aber auch mit Hilfe dieser Ringerweiterungsreaktion noch nicht erzielt werden.

4.5.2.1.3. Selektive Oxydation mit m-Chlorperbenzoesäure

Aufbauend auf Untersuchungen von Cramer u. Seidel (537), die Monoperphthalsäure zur Oxydation benutzten, führten Delia et al. (522) 1965 mit m-Chlorperbenzoesäure ein hochselektives Reagens zur Darstellung von N-Oxiden aus tertiären Aminen ein. Hieraus entwickelten sich noch zahlreiche Modifikationen der Anwendungstechnik, über die in Kap. 4.5.3.1.0. ausführlich berichtet werden soll.

4.5.2.2.0. Darstellung der 3-Acetoxyverbindung

Bezüglich der Umsetzung von N-Oxiden mit Acetanhydrid existieren in der Hauptsache zwei Varianten: Delia et al. (522) benutzen Acetanhydrid nicht gleichzeitig auch als Lösungsmittel für die N-Oxide sondern empfehlen den Zusatz doppelter Mengen an Eisessig. Bell und Childress (535) arbeiten lediglich im binären System N-Oxid / Acetanhydrid. Für den Zeitbedarf der Polonovski-Reaktion werden Zeiten zwischen 20 Minuten (535) und 20 Stunden (522) angegeben. Auch in den vorliegend beschriebenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Reaktion selbst bei strukturell sehr eng verwandten Verbindungen (z.B. 5-Chlor- bzw. 5-Nitro-substituierte Benzodiazepine) unterschiedlich schnell abläuft. Nähere Einzelheiten s. Kap. 4.5.3.2.0. bzw. 4.5.4.2.0.

4.5.2.3.0. Hydrolyse der 3-Acetoxyverbindung zum 3-Hydroxyderivat

Zur Spaltung der 3-Acetoxyverbindung in die 3-Hydroxyderivate wird ausschließlich die alkalische Hydrolyse empfohlen, da sie praktisch quantitativ verläuft. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen ergab sich jedoch die Notwendigkeit einer

Modifikation: Während sich 3-Hydroxydiazepam, Oxazepam und 3-Hydroxyprazepam stets in guter Ausbeute durch eine *a l k a l i s c h e* Hydrolyse aus den entsprechenden 3-Acetoxyverbindungen gewinnen ließen, traten bei der Behandlung von 3-Acetoxyflunitrazepam mit Natronlauge ausnahmslos immer noch mindestens zwei intensiv gelbgefärbte NebenkompONENTEN auf, so daß die Ausbeute stark eingeschränkt war und außerdem umfangreiche Trennungsschritte erforderlich waren. In diesem letzteren Fall führte eine saure Hydrolyse (auch auf der DC-Platte) zu besseren Ergebnissen.

Auf den Einfluß höherer Temperaturen und Licht, sowie Schädigungen der Sorbenschicht durch wäßrige alkalische Lösungen wird in den Kap. 4.5.3.3.0. bzw. 4.5.4.3.0. ausführlicher eingegangen.

4.5.3.0.0. Praktische Durchführung als Lösungsreaktion

4.5.3.1.0. Darstellung des N-Oxids mit m-Chlorperbenzoesäure

In Kap. 4.5.2.1.3. wurde bereits darauf hingewiesen, daß bezüglich der Anwendung von m-Chlorperbenzoesäure zahlreiche Varianten existieren, von denen einige im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit zur Darstellung von Benzodiazepin-N-Oxiden überprüft wurden.

4.5.3.1.1. Modifikation nach Craig und Purushothaman (526)
Eine 1 molare Lösung von m-Chlorperbenzoesäure in Chloroform wird langsam zu einer eisgekühlten Lösung des Amins (1 molar in Chloroform) gegeben. Nach ca. 3 stündigem Rühren (zunächst bei 0 - 5°C, später bei Raumtemperatur) wird das Reaktionsgemisch über eine Aluminiumoxidsäule gegeben und mit Methanol/Chloroform (1:3) eluiert, nachdem nicht umgesetztes Amin vorher mit Chloroform ausgewaschen wurde.

Bei Versuchen mit Trimethylamin, Tribenzylamin, Dimethylanilin, Nikotin, Codein und Morphin ergaben sich nach Umkristallisieren

aus Alkohol / Äther bzw. Aceton / Hexan Ausbeuten zwischen 86 und 98% (526).

4.5.3.1.2. Modifikation nach Delia, Olsen und Brown (522)

Eine Lösung von 0,008 Mol Amin in 30 ml Eisessig wird mit 0,02 Mol m-Chlorperbenzoesäure versetzt, 1 Stunde bei 60°C erwärmt und anschließend unter Rühren in 400 ml Wasser gegeben. Nach dem Umkristallisieren des hierbei ausgefallenen Niederschlages aus Methanol 90% / Essigsäureäthylester ergaben sich bei Cytosin Ausbeuten um 41 % (522).

4.5.3.1.3. Modifikation nach Hansen und Boyd (523)

Eine Lösung von 0,05 Mol 80%iger m-Chlorperbenzoesäure in 75 ml Methylenchlorid wird tropfenweise zu einer Lösung von 0,05 Mol Amin in 25 ml Methylenchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird kräftig gerührt und 2 Stunden unter Rückfluß erwärmt. Danach wird der Methylenchlorid-anteil im Vakuumrotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in ca. 500 ml Diäthyläther gelöst. Beim anschließenden Durchleiten von Ammoniakgas fällt das Ammoniumsalz der als Reaktionsprodukt entstandenen m-Chlorbenzoesäure aus und kann abfiltriert werden. Nach dem Verflüchtigen des Äthers im Vakuumrotationsverdampfer kann aus n-Hexan umkristallisiert werden. Ausbeute bei Oxazolderivaten bei ca. 96% (523).

4.5.3.1.4. Modifikation nach Sigg und Toth (524)

260 mg 1,6-Dimethoxyphenazin werden in 20 ml Benzol suspendiert und mit einer Lösung von 550 mg m-Chlorperbenzoesäure (84 %ig) in 15 ml Benzol versetzt. Nach 19 Stunden bei 20°C wird die nunmehr klare Lösung im Vakuum zur Trockne

gebracht. Nach Reinigen über eine Kieselgelsäule (MERCK, 0,05-0,2 mm) und Umkristallisieren aus Benzol / Pentan ca. 20-25% Ausbeute (524).

4.5.3.1.5. Vergleichende Betrachtung der Brauchbarkeit der einzelnen Modifikationen für die Bildung von Benzodiazepin-N-Oxiden

Die einzelnen Varianten wurden hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit in der Benzodiazepinchemie überprüft. Es ergaben sich folgende Resultate:

a) Modifikation nach Craig und Purushothaman (526).

Unter den in Kap. 4.5.3.1.1. beschriebenen Versuchsbedingungen konnte kein befriedigender Umsatz erzielt werden. Auch eine Temperaturerhöhung (einige Stunden in Chloroform unter Rückfluß erwärmt) erbrachte nur eine unwesentliche Steigerung der Ausbeute (DC-Kontrolle).

b) Modifikation nach Delia, Olsen und Brown (522).

Bei der Durchführung als Lösungsreaktion ergaben sich gute Ausbeuten. Störend, im Vergleich zu den anderen beschriebenen Methoden, wirkte sich aus, daß Eisessigspuren nur mit erhöhtem Aufwand entfernt werden konnten (präparative dünnschichtchromatographische Reinigung). Bei unvollständiger Entfernung traten insbesondere bei der Massenspektrometrie zahlreiche intensive Störpeaks auf.

Für die N-Oxidbildung auf der DC-Platte erwies sich die Modifikation von Delia et al. als sehr brauchbar, da die geringere Flüchtigkeit von m-Chlorperbenzolösungen in Eisessig eine längere Reagenseinwirkung auch bei höheren Temperaturen ermöglichte. Die Problematik einer Verunreinigung des Reaktionsproduktes durch Lösungsmittelreste spielte in

diesem Fall eine untergeordnete Rolle, da nach Reaktionen auf der DC-Platte eine anschließende dünn-schichtchromatographische Reinigung ohne besonderen zusätzlichen Aufwand leicht möglich ist.

c) Modifikation nach Hansen und Boyd (523)

Diese Variante erbrachte in Form der Lösungsreaktion optimale Ergebnisse, konnte aber wegen der Leichtflüchtigkeit des Lösungsmittels für Reaktionen auf der DC-Platte nur beschränkt eingesetzt werden.

In Abb. 26 ist, stellvertretend für die mit allen Substanzen stets durchgeführten gleichartigen Untersuchungen, eine Verlaufskontrolle der Umsetzung von Prazepam zu Prazepam-N-Oxid mittels der Variante nach Hansen und Boyd (523) dargestellt.

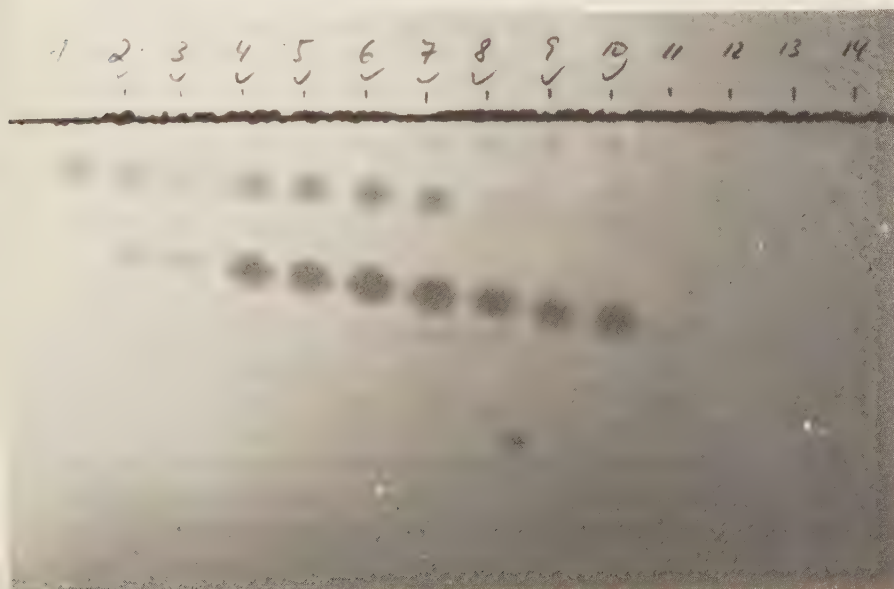


Abb. 26

Vor der Zugabe von m-Chlorperbenzoesäure (1) und danach wurden bei verschiedenen Reaktionszeiten (2 = nach 10 min, 3 = nach 30 min, 4 = nach 60 min, 5 = nach 90 min, 6 = nach 120 min, 7 = nach 150 min, 8 = nach 240 min, 9 = nach 330 min, 10 = nach 390 min) Proben entnommen und am Start eines Dünnschichtchromatogrammes aufgetragen. Nach der Entwicklung mit Benzol / Iso-Propanol / Ammoniak konz. (80 + 20 + 1; v/v/v) und Betrachtung unter UV-Licht (254 nm) konnte der Reaktionsverlauf deutlich verfolgt werden. Die kontinuierliche Abnahme der R_F -Werte dürfte z.B. auf Reaktionen unumgesetzter m-Chlorperbenzoesäure mit Fließmittelkomponenten zurückzuführen sein. Eine Gradientenbildung kommt dadurch zustande, daß zum Zeitpunkt des Reaktionsbeginnes aufgetragene m-Chlorperbenzoesäure längere Zeit zum Zerfall (z.B. in Sauerstoff und m-Chlorbenzoesäure) zur Verfügung hat, als beispielsweise später entnommene Proben. Die Identität der Substanzen wurde in jedem Fall durch Spektren belegt.

d) Modifikation nach Sigg und Toth (524)

Da Benzol infolge seiner Toxizität für umfangreichere Sprühversuche im Rahmen von Reaktionen auf der DC-Platte vermieden werden sollte, entfiel eine eingehendere Erprobung dieser Variante.

4.5.3.1.6. Durchführungsvorschrift für die erarbeitete Methode zur Darstellung von Benzodiazepin-N-Oxiden

Die N-Oxidbildung gelang bei den untersuchten Benzodiazepinen (Prazepam, Diazepam, Nor-Diazepam und Flunitrazepam) in stets hoher Ausbeute und vertretbarem Zeitaufwand, wenn folgender-

maßen vorgegangen wurde:

Zu einer Lösung von 15 - 20 mg Benzodiazepin in 5 ml Methylenchlorid werden 5 ml m-Chlorperbenzoesäurelösung (500 mg 3-Chlorperbenzoesäure, z.B. Art.Nr. 810156 von MERCK in 100 ml Methylenchlorid) gegeben. Im Verlauf der Reaktionsdauer von etwa 4 - 5 Stunden (dünnschicht-chromatographische Verlaufskontrolle vgl. Abb. 26) erfolgt etwa alle 30 Minuten eine weitere Zugabe von je 1 ml m-Chlorperbenzoesäurelösung (s.o.). Das Reaktionsgemisch wird bei ca. 50°C unter Rückfluß erwärmt. Nach beendeter Reaktion wird der Lösungsmittelanteil im Vakuumrotationsverdampfer abgezogen. Der verbleibende Rückstand (hauptsächlich Benzodiazepin-N-Oxid, m-Chlorbenzoesäure und evtl. m-Chlorperbenzoesäure) wird in etwa 1 - 2 ml Aceton aufgenommen und mit Hilfe eines Chromatocargers auf der Startlinie einer präparativen Dünnschichtplatte (z.B. Art.Nr. 5717 von MERCK) aufgetragen. Beim anschließenden Entwickeln der Platte mit Benzol / iso-Propanol / Ammoniak konz. (80 + 20 + 5; v/v/v) verbleiben die Benzoesäurederivate am Startpunkt oder in seiner unmittelbaren Nähe, während die N-Oxide bei weit höheren R_f -Werten (etwa 0,7) indiziert, ausgeschabt und eluiert werden können (z.B. mit Essigsäureäthylester). Die Benzodiazepin-N-Oxide sind wie fast alle N-Oxide stark hygroskopisch.

4.5.3.2.0. Darstellung der 3-Acetoxyverbindung aus den N-Oxiden

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß ein Zusatz von Eisessig zur Reaktionslösung, wie er nach Delia et al. (522) vorgeschrieben ist, im Falle der Umsetzung von Benzodiazepin-N-Oxiden zu den entsprechenden 3-Acetoxyverbindungen

nicht erforderlich ist. Gute Ausbeuten ergaben sich mit Hilfe folgender Arbeitsweise:

5-10 mg Benzodiazepin-N-Oxid werden in einer QUICKFIT-Rückflußvorrichtung ca. 30 Minuten mit 0,2 - 0,5 ml Essigsäureanhydrid auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. In dieser Zeit setzten sich die N-Oxide von Prazepam, Diazepam und Nor-Diazepam nahezu quantitativ in die entsprechenden 3-Acetoxyverbindungen um. Lediglich beim Umsatz von Flunitrazepam-N-Oxid zu 3-Acetoxyflunitrazepam waren bis zu 4-stündige Einwirkungszeiten erforderlich. Zur Gewinnung spektralreiner Derivate wurden die 3-Acetoxyverbindungen ebenfalls präparativ-dünnschichtchromatographisch gereinigt, zumal Spuren von Acetanhydrid nur schwierig durch Destillation unter Vakuum zu entfernen waren.

4.5.3.3.0. Hydrolyse zur 3-Hydroxyverbindung

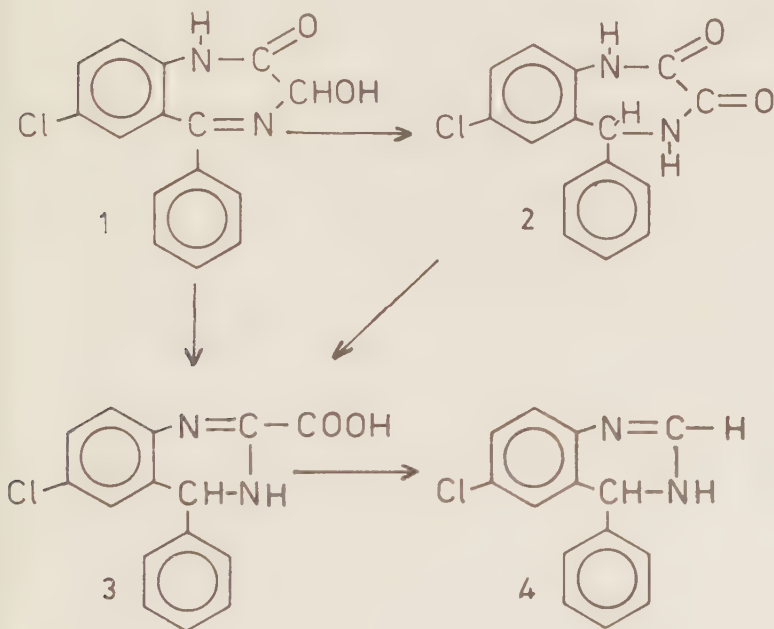
Bei der Durchführung dieses zunächst als einfach anzusehenden Reaktionsschrittes ergaben sich vielerlei Schwierigkeiten im Falle der Verseifung von 3-Acetoxyflunitrazepam, während die Hydrolyse von 3-Acetoxyprazepam, 3-Acetoxydiazepam und 3-Acetoxy-nor-diazepam zu den korrespondierenden 3-Hydroxyverbindungen bei Beachtung der nachstehend geschilderten Vorsichtsmaßnahmen glatt und ohne Störungen verlief.

4.5.3.3.1. Alkalische Hydrolyse

5-10 mg 3-Acetoxyverbindung werden in 2 ml absolutem Äthanol gelöst und mit 0,15 ml 4 N Natronlauge versetzt. Nach etwa 30 min (während dieser Zeit darf die Lösung allenfalls schwach erwärmt werden, keinesfalls erhitzt) wird mit Essigsäure schwach angesäuert, nachdem vorher ca. 2 ml

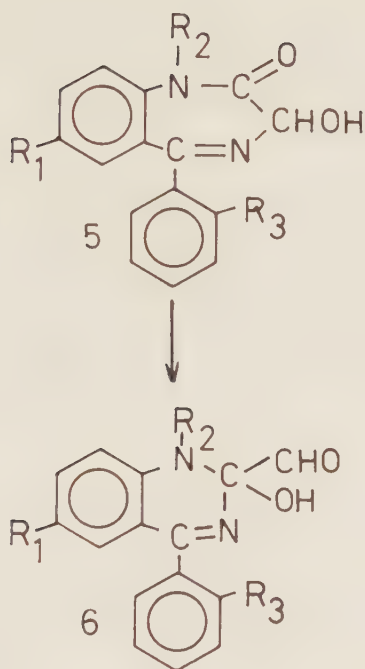
dest. Wasser zugefügt wurden. Die Extraktion der 3-Hydroxyverbindungen erfolgt in guter Ausbeute mit Essigsäureäthylester. Auch nach dieser Reaktion schließt sich vorteilhaft eine präparativ-dünnschichtchromatographische Reinigung der Substanz mit Chloroform / Aceton (80 + 20; v/v) an.

Während der Reaktion ist auch ganz besonders jegliche Lichteinwirkung, insbesondere Sonnenlicht, zu vermeiden. Nach Bell und Childress (535) können bei Oxazepam unter dem Einfluß von Alkali, Wärme bzw. Licht folgende Derivate entstehen:



Nach alkalischer Hydrolyse mit Temperaturen oberhalb von etwa 50°C konnte bei den vorliegenden Untersuchungen lediglich eine Substanz isoliert werden, deren IR-Spektrum in Kap. 4.6.0.0.0. (als "Derivat von 3-Hydroxydiazepam bzw. 3-Hydroxyprazepam" bezeichnet) wiedergegeben ist. Eine endgültige Strukturaufklärung steht noch aus, ist aber beabsichtigt. Höchst bemerkenswert erscheint, daß sowohl die 3-Hydroxyverbindungen als auch ihre jeweils bei höherer Temperatur bei der alkalischen Hydrolyse entstandenen Derivate (s.o.) trotz extrem unterschiedlicher IR-Spektren praktisch identische Massenspektren liefern (vgl. Kap. 4.6.0.0.0.; Massenspektren von 3-Hydroxyprazepam bzw. "Umlagerungsprodukt von 3-Hydroxyprazepam"): Dies berechtigt zu der Annahme, daß sich die "Derivate der beschriebenen 3-Hydroxyverbindungen" aus den betreffenden 3-Hydroxyderivaten auch im Einlaßteil des Massenspektrometers bildeten. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß sich aus beiden Reaktionsprodukten ein weiteres Derivat gebildet hat, dem die in Kap. 4.6.0.0.0. abgebildeten übereinstimmenden Massenspektren entsprechen. In erster Linie wäre hierbei an eine Verbindung zu denken, wie sie von Frigerio et al. (378) im Zusammenhang mit Untersuchungen gaschromatographischen Inhalts beschrieben wurde, vgl. hierzu das nächste Formelschema (S. 163).

Indizien für das Auftreten dieser Struktur wären auch darin zu sehen, daß das Massenspektrum der 3-Hydroxyverbindungen in allen untersuchten Fällen einen mehr oder weniger ausgeprägten $M^+ - 29$ - Peak enthält (meist sogar Basispeak), der einer bei Carbonylverbindungen bevorzugt auftretenden Abspaltung von $-CHO$ zugeschrieben werden kann und daß der ansonsten für Hydroxyverbindungen typische $M-18$ Peak fehlt (Ausnahme Oxazepam).



Auch im m/e -Bereich $M^+ - 44$ (d.h. Abspaltung von CO_2 , die bei Struktur 6 im vorliegenden Schema zu erwarten ist) liegen fast ausnahmslos intensive Signale vor (vgl. Kap. 4.6.0.0.0.).

Eine hauptsächliche Bildungstendenz für die ungewöhnliche Struktur 6 dürfte einerseits in der gesteigerten Stabilität von 6er-Ringsystemen, andererseits aber auch in den besonderen energetischen Verhältnissen im Einlaßteil von GC- bzw. MS-Geräten zu sehen sein.

Eine weitere Bestätigung dieser Interpretation der Versuchsergebnisse wäre auch darin zu sehen, daß die Bildung von Derivat 6 aus den postulierten bzw. synthetisierten Ausgangsverbindungen 1 und 2 (im Gegensatz zu 3 und 4) durchaus eine Alkylsubstitution am Stickstoffatom N-1 des Benzodiazepin-grundgerüsts zulässt. In Übereinstimmung hierzu konnten die dargelegten Reaktionen ausnahmslos gerade auch bei den N-1-alkylierten Benzodiazepinen verifiziert werden.

4.5.3.3.2. Saure Hydrolyse

Wie bereits ausgeführt wurde (Kap. 4.5.3.3.0.), konnten mit Hilfe der sonst bei niedrigen Temperaturen glatt verlaufenden alkalischen Hydrolyse im Falle der Verseifung von 3-Acetoxyflunitrazepam nur unbefriedigende Ausbeuten erzielt werden. Es bildeten sich stets zwei intensiv gelb gefärbte Nebenprodukte, die bei der dünnschichtchromatographischen Reinigung z.B. mit Chloroform / Aceton (80 + 20; v/v) auf Kieselgel 60 - Platten bei höheren R_f -Werten zu indizieren waren. Weiterführende Untersuchungen ergaben, daß hier ausnahmsweise eine saure Hydrolyse (ca. 2-3 Stunden mit 2 N Salzsäure bei 30°C) empfohlen werden kann, die zwar zu Ausbeuten unter ca. 50 % führt, die Zahl der Reaktionsprodukte jedoch praktisch nur auf das 3-Hydroxyderivat beschränkt. Die nicht umgesetzte Ausgangssubstanz 3-Acetoxyflunitrazepam kann erneut eluiert werden und einer weiteren sauren Hydrolyse als Substrat dienen. Die vorliegenden Unter-

suchungen bestätigten wiederum, daß die saure Esterhydrolyse lediglich zu einem Gleichgewicht führt, während die alkalische Durchführungsform durch Salzbildung der Säurekomponente und dadurch bedingtem Gleichgewichtsentzug praktisch quantitativ verläuft.

4.5.4.0.0. Praktische Durchführung auf der DC-Platte

Die einzelnen Reaktionsschritte wurden in den Kap. 4.5.2.0.0. und 4.5.3.0.0. bereits ausführlich dargestellt, sodaß sich die nachstehenden Ausführungen auf die Einzelheiten beschränken können, die für die Durchführung auf der DC-Platte typisch und wichtig sind.

4.5.4.1.0. Darstellung der Benzodiazepin-N-Oxide

Auf der Startlinie einer DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F₂₅₄ (z.B. Art.Nr. 5717 MERCK) werden 2 - 3 mg Benzodiazepin als Lösung (z.B. in Essigsäureäthylester) gleichmäßig aufgebracht. Hierzu bedient man sich zweckmäßigerweise eines technischen Hilfsgerätes (z.B. Chromatocharger von CAMAG). Nach dem Verflüchtigen des Lösungsmittels besprüht man die Startzone mit einer Lösung von 200 mg m-Chlorperbenzoesäure in 50 ml Eisessig. Hierbei ist die Platte, wie in Abb. 21 dargestellt, mit einer geeigneten Hilfsvorrichtung abzudecken. Ein Aufsprühen der Lösung hat den Vorteil, daß die gesamte Reaktionszone gleichmäßig mit Reagens benetzt ist. Bei Versuchen, auch die m-Chlorperbenzoesäurelösung mit Hilfe des Chromatochargers aufzubringen, konnte beobachtet werden, daß die Ausbeuten an N-Oxid stark abnahmen. Hierfür war der folgende Effekt verantwortlich zu machen: Beim nahezu strichförmigen Auftreffen auf die Startlinie nach dem Austritt aus der Spritze breitete sich die relativ

polare m-Chlorperbenzoesäurelösung auf der Startzone nach oben und unten aus und "schiebt" hierbei den Benzodiazepin-anteil praktisch vor sich her in die beiden Randzonen, wobei nur eine geringe Reaktion stattfinden kann. Dieser Vorgang wiederholte sich bei jedem erneuten Auftragevorgang. Beim Besprühen wurde dagegen jeweils die gesamte Reaktionsfläche gleichmäßig mit frischem Reagens versetzt.

Optimal wurde so verfahren, daß in zeitlichen Abständen von etwa 20 Minuten besprüht wurde. In der Zwischenzeit wurde die Dünnschichtplatte in einem auf etwa 70°C vorgeheizten Wärmeschrank aufbewahrt. Bei den Untersuchungen erwies es sich als zweckmäßig, den Sprühvorgang möglichst oft zu wiederholen, da so eine kontinuierliche Steigerung der Ausbeute erzielt werden konnte.

Nach Beendigung der Behandlung mit m-Chlorperbenzoesäure wurde die Platte mit Benzol / iso-Propanol / Ammoniak konz. (80 + 20 + 2; v/v/v) entwickelt. Hierbei blieben die Anteile an m-Chlorbenzoesäure und m-Chlorperbenzoesäure am Startbereich, während die gebildete N-Oxidverbindung deutlich höhere R_f -Werte aufwies. Unumgesetztes Benzodiazepin wanderte praktisch mit der Fließmittelfront.

Zur Gewinnung spektralreiner Substanzen wurde mit Essigsäureäthylester eluiert, eingengt, mit Aceton aufgenommen und anschließend zentrifugiert, wobei sich die mit Essigsäureäthylester mitextrahierten bzw. gelösten Kieselgelanteile aus dem Sorbensmaterial abtrennen ließen, da sie in Aceton kaum löslich sind. Der Überstand wurde abgesaugt, wiederum eingengt und verschiedenen Meßverfahren zugeführt.

Sollten die N-Oxide nicht für chromatographische bzw. spektroskopische Messungen benötigt werden, sondern weiteren

Reaktionen dienen, so entfiel natürlich die Elution. In diesem Falle empfahl es sich jedoch, dennoch kurze Zeit in dem angegebenen Fließmittel zu entwickeln, um so eine Trennung von den m-Chlorbenzoessäurederivaten zu bewirken.

4.5.4.2.0. Darstellung der 3-Acetoxyverbindung

Diese Reaktion verlief glatt und mit hoher Ausbeute nach Besprühen der N-Oxide mit Essigsäureanhydrid, Abdecken des Chromatogrammes mit einer Glasplatte und Erhitzen auf 100°C (jeweils 30 Minuten zwischen zwei Sprühschritten). Bei einzelnen Benzodiazepinen (insbesondere bei Flunitrazepam) erwies sich eine mehrmalige Wiederholung des Sprühvorganges als notwendig.

Zur Messung von Spektren wurde auch die jeweilige 3-Acetoxyverbindung vorteilhaft mit Essigsäureäthylester eluiert, woran sich die unter 4.5.4.1.0. ausführlich beschriebene Technik der Reinigung von Kieselgelbestandteilen anschloß.

4.5.4.3.0. Darstellung der 3-Hydroxyverbindung

Bei Sprühversuchen mit wäßrigen Natronlauge-Lösungen und anschließendem Erwärmen konnte ein Abblättern der Sorbenschicht beobachtet werden, sodaß zunächst nur ein Weg brauchbar erschien, nämlich die auf der Platte gebildete 3-Acetoxyverbindung zu eluieren, in Lösung zu hydrolysieren, erneut auf eine DC-Platte zu bringen und anschließend wiederum präparativ-chromatographisch zu trennen.

In späteren Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, daß sich bei Verwendung etwa 0,5%iger äthanolischer Alkalilauge und nur geringfügigem Erwärmen die Hydrolyse auch auf der Platte ohne Zerstörung der Sorbensschicht durchführen ließ.

4.5.4.4.0. Ergebnisse und Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß sich auch die Reaktionen zur mehrstufigen Synthese der 3-Hydroxyverbindungen auf der DC-Platte durchführen lassen. Naturgemäß konnten hier jedoch nicht die hohen Ausbeuten erzielt werden, wie sie etwa bei der Reduktion und Acetylierung der 7-Nitrogruppe von Flunitrazepam auftraten, vgl. Kap. 4.3.0.0.0.

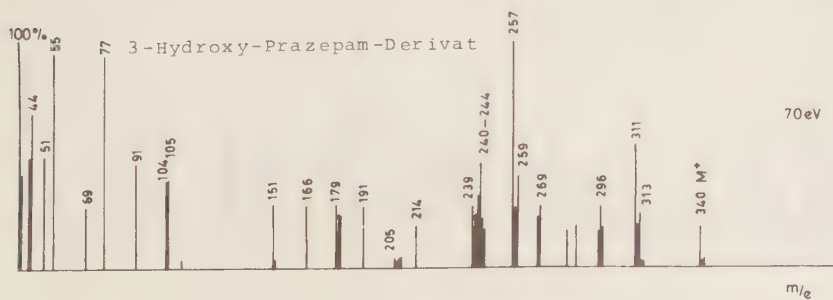
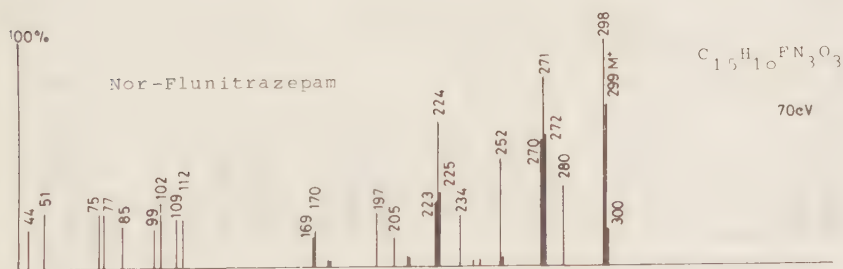
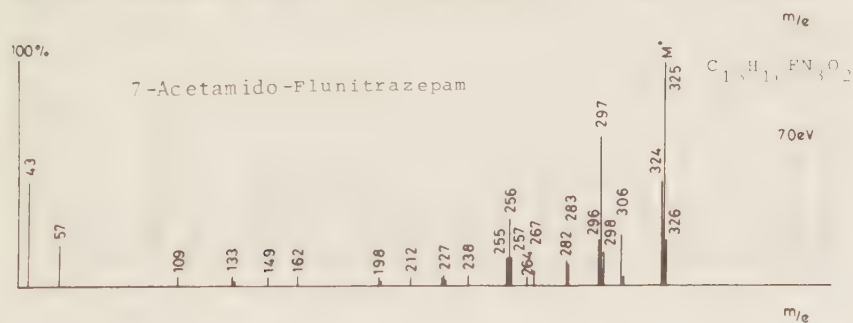
Im Gegensatz zur photolytischen Desalkylierung (vgl. Kap. 4.4.0.0.0.), bei der in Lösung keine nennenswerten Ausbeuten erfolgten, stellen die konventionellen Reaktionen zur Darstellung von 3-Hydroxybenzodiazepinen, wie sie in Kap. 4.5.0.0.0. ausführlich abgehandelt werden, eine zumindest gleichrangige Alternative zur Reaktion auf der Dünnschichtplatte dar, obwohl Reaktionen auf der DC-Platte in Bezug auf die Handhabung von Milligramm- bzw. Mikrogramm-Mengen von der Methodik her deutlich überlegen sind.

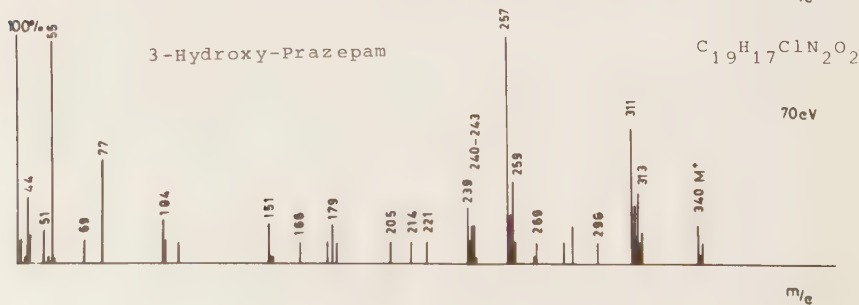
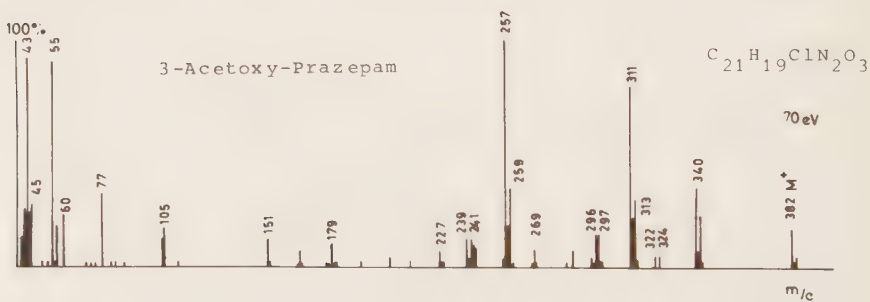
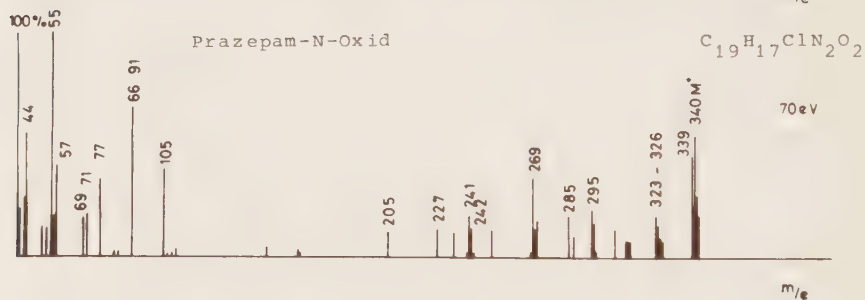
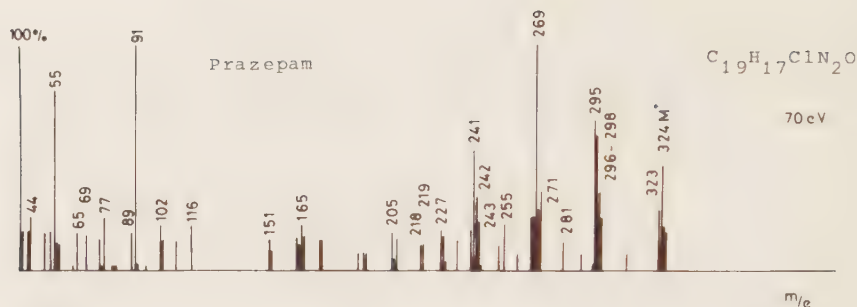
Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und Diskussion wurde in Kap. 5 und 6 vorgenommen.

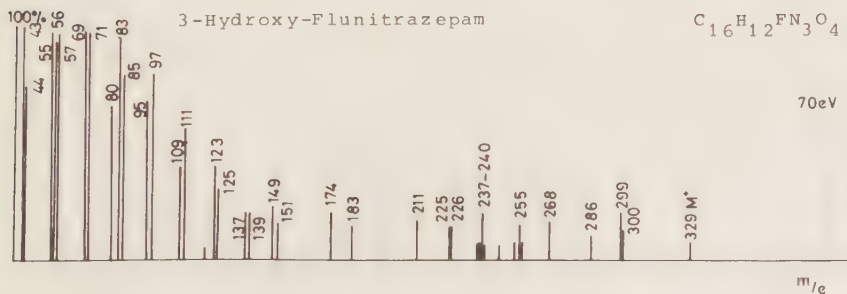
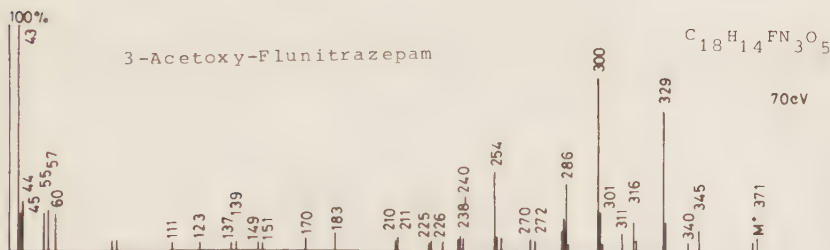
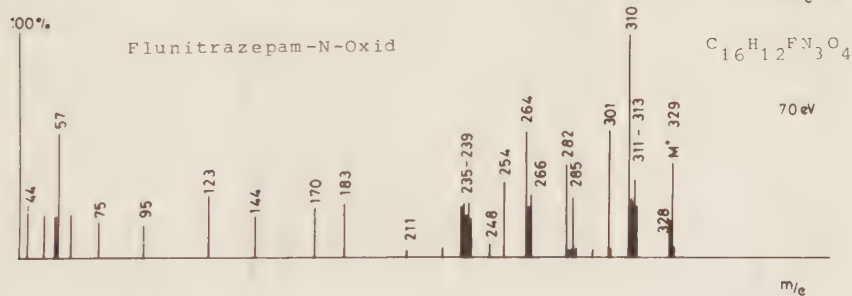
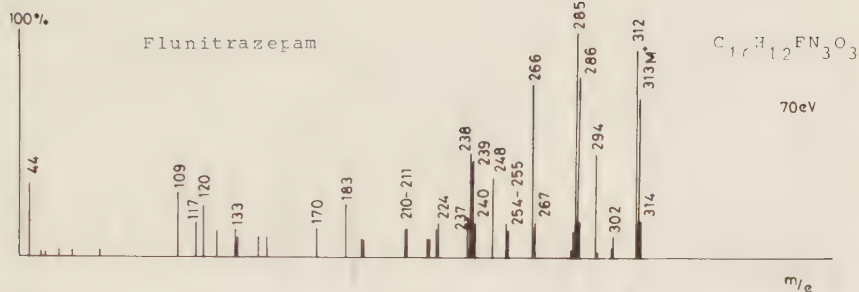
4.6.0.0.0. Spektren

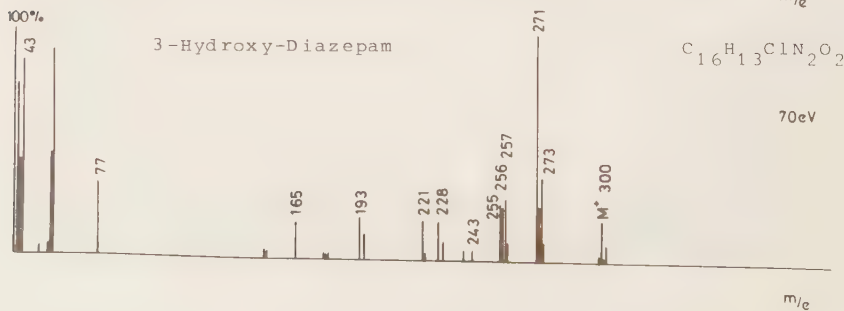
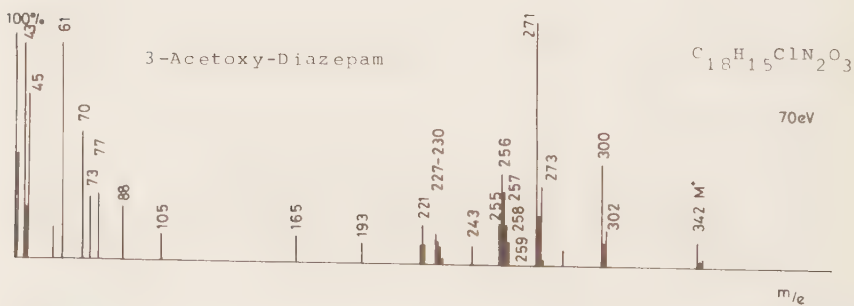
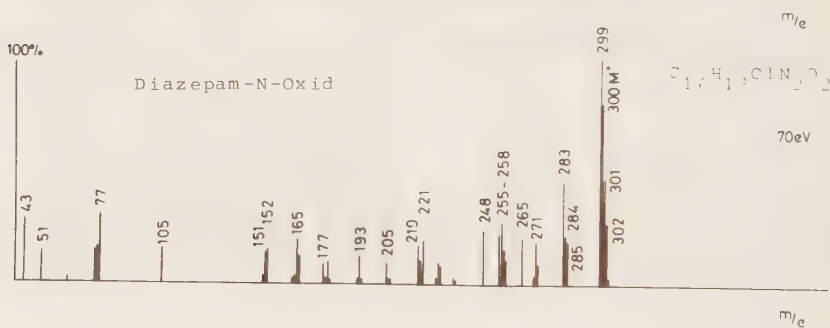
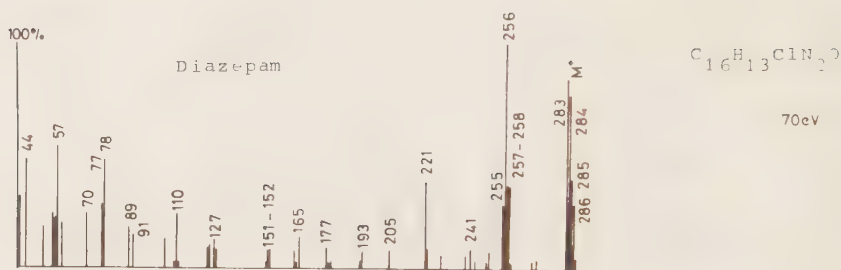
Auf den folgenden Seiten sind die Spektren der in Kap. 4.3.0.0.0. bis 4.5.0.0.0. behandelten Substanzen wiedergegeben.

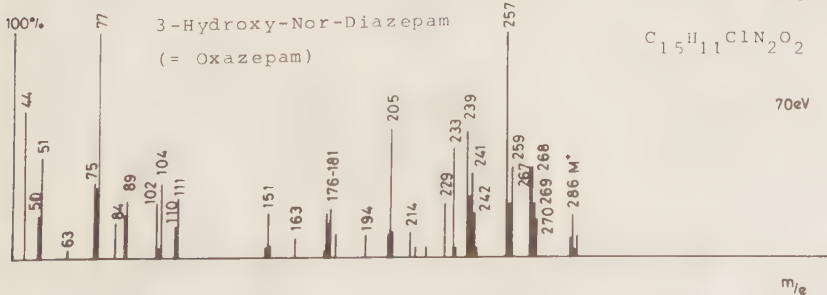
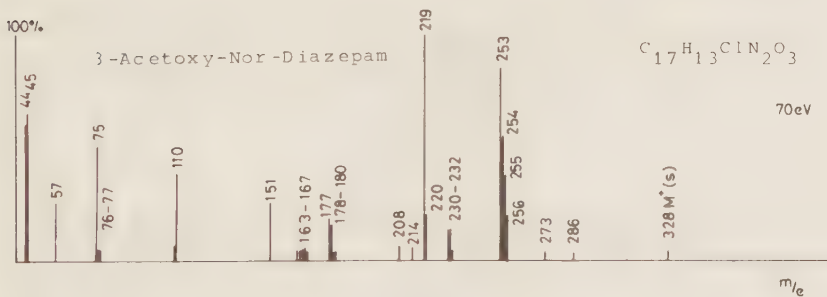
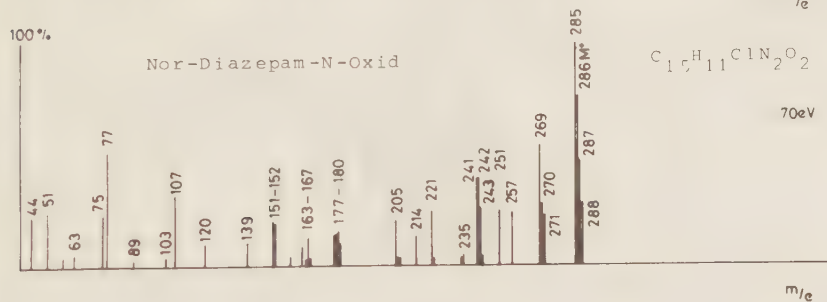
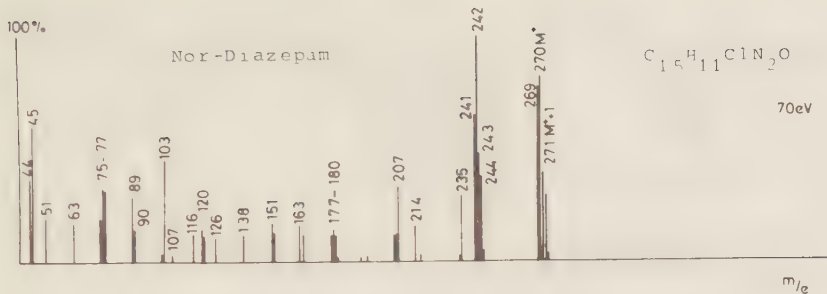
Eine endgültige Struktursicherung **a l l e i n** aufgrund der IR-Spektren konnte in einigen Fällen nicht eindeutig getroffen werden, da die IR-Spektren der Benzodiazepinderivate, bedingt durch das Vorhandensein vieler funktioneller Gruppen, die sich zudem noch meist in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden und sich daher wechselseitig in der Lage der Peaks beeinflussen, relativ kompliziert sind und daher durch andere strukturaufklärende analytische Methoden (wie die durchgeführten Massenspektren) notwendigerweise ergänzt werden müssen.

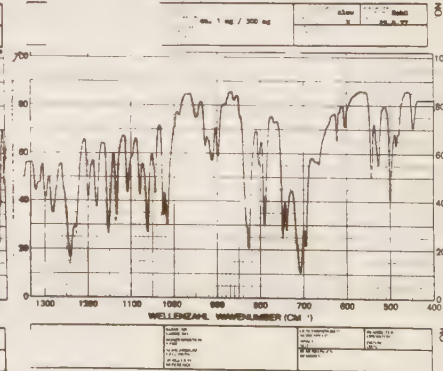
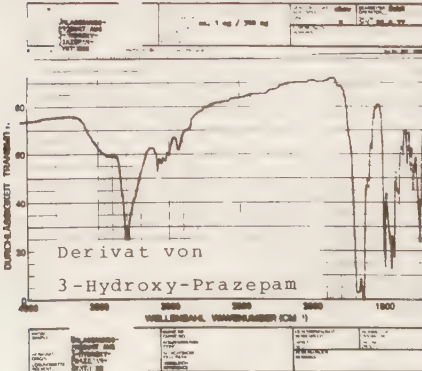
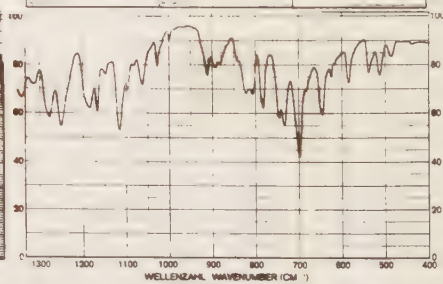
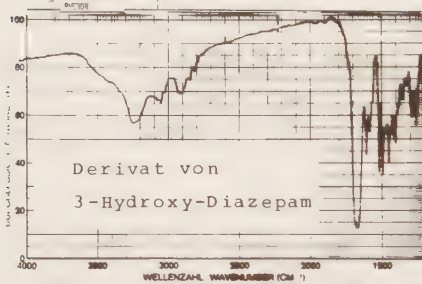
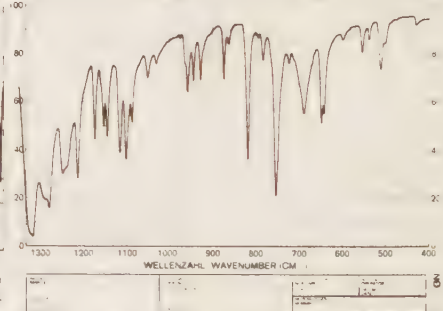
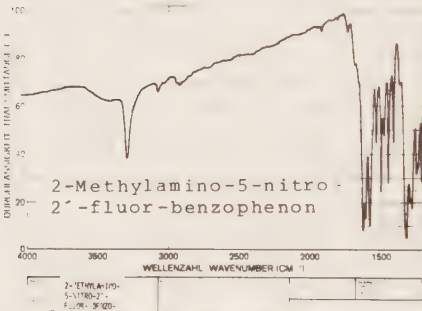
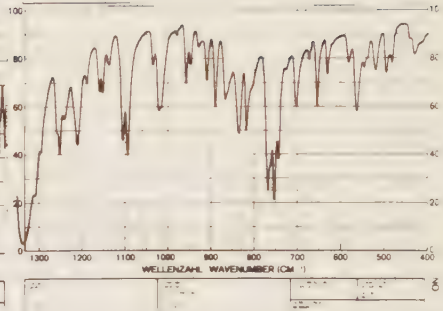
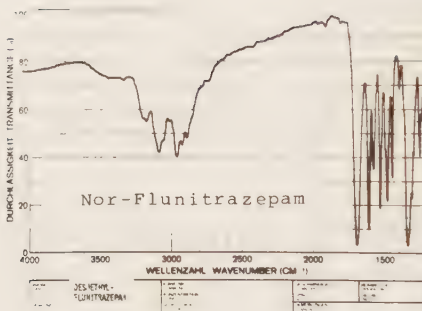


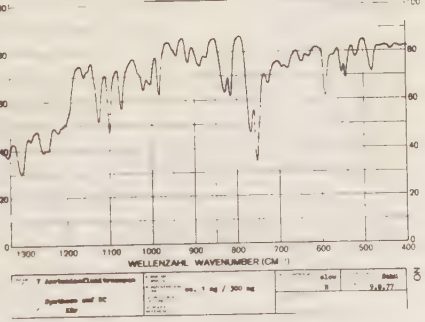
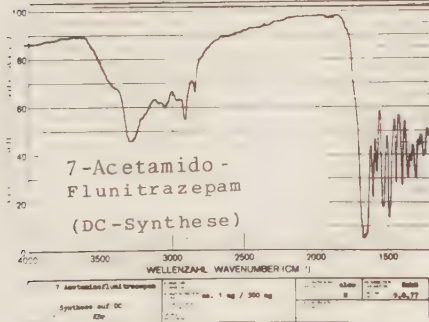
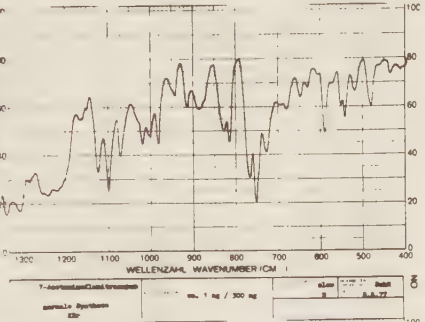
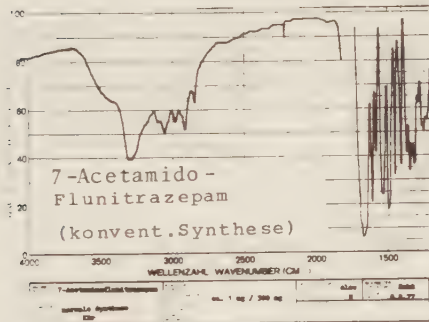
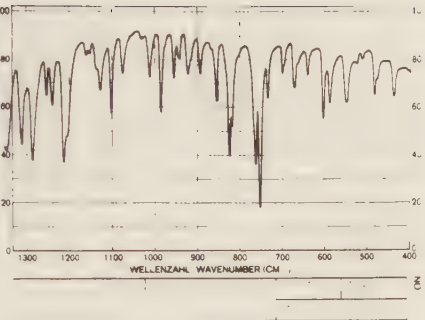
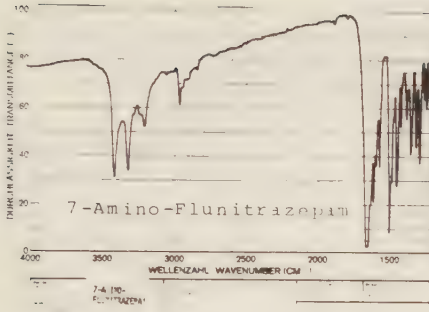


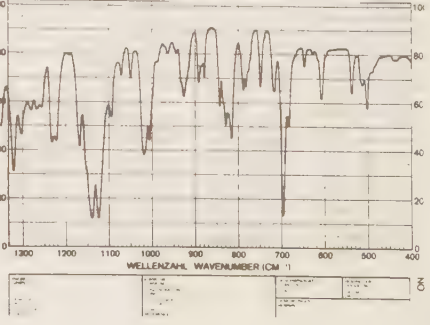
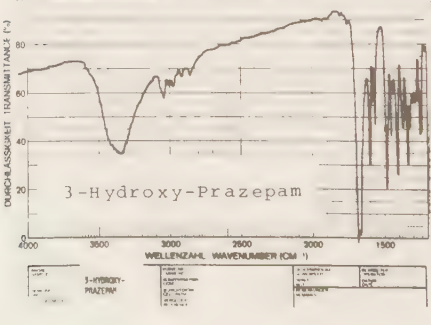
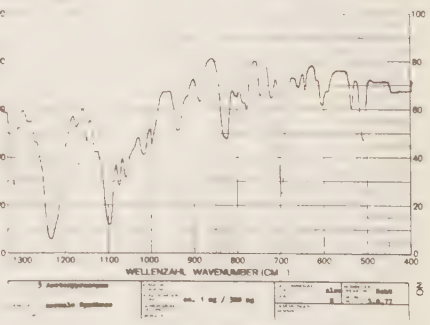
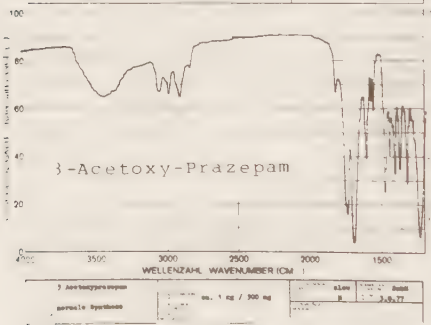
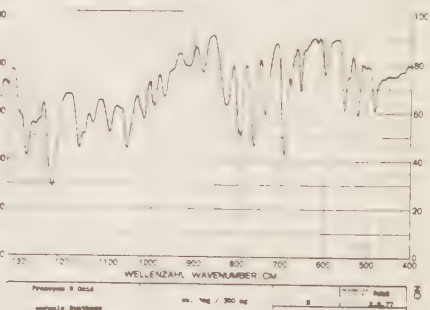
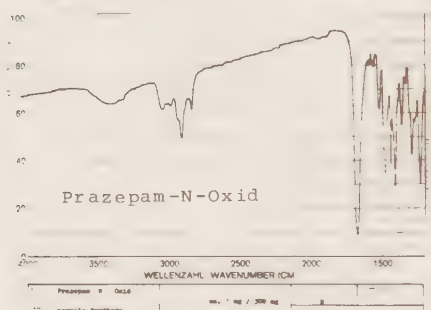
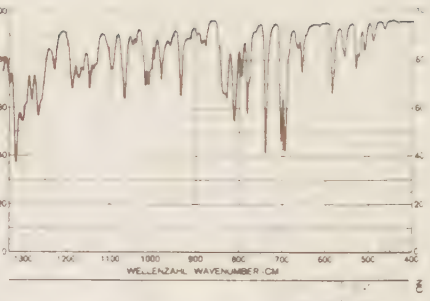
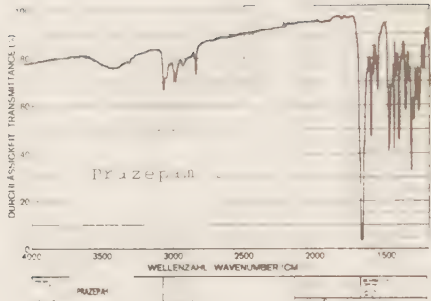


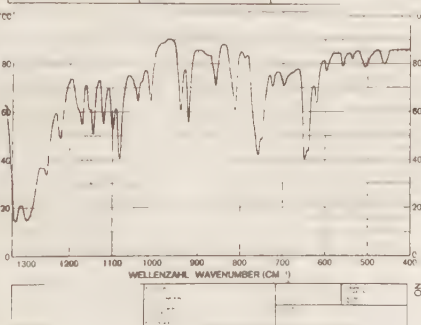
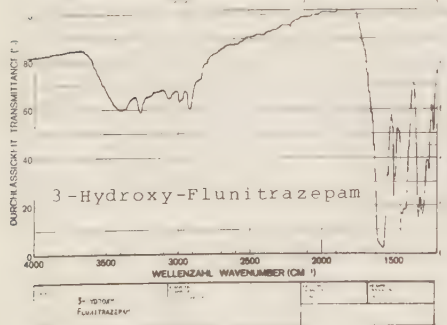
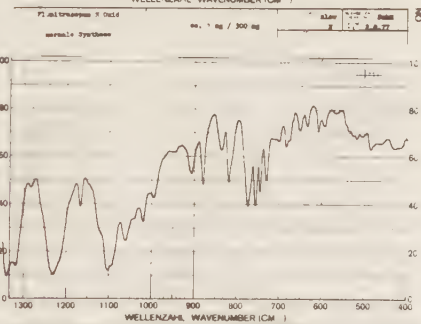
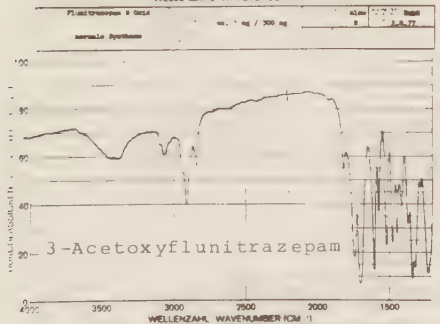
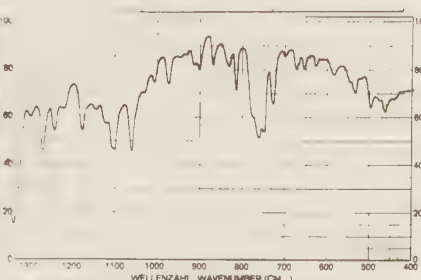
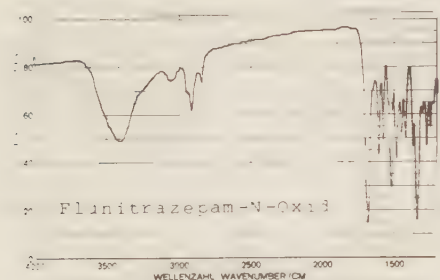
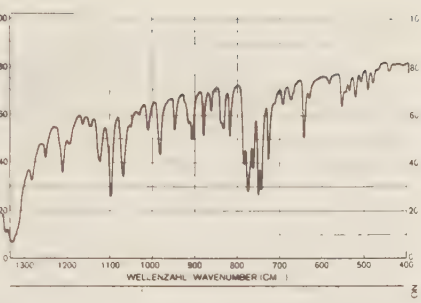
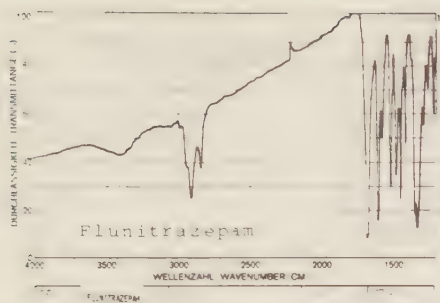


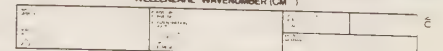
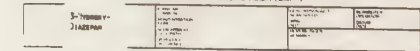
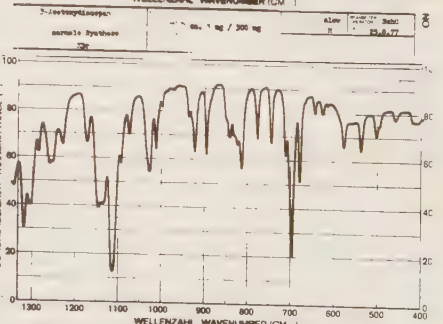
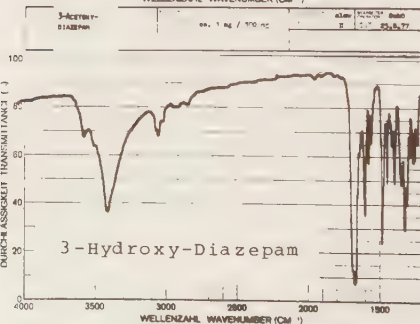
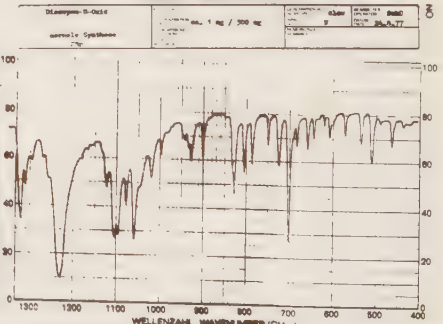
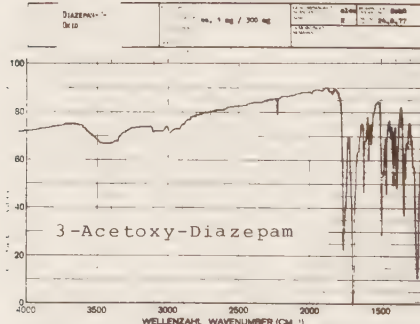
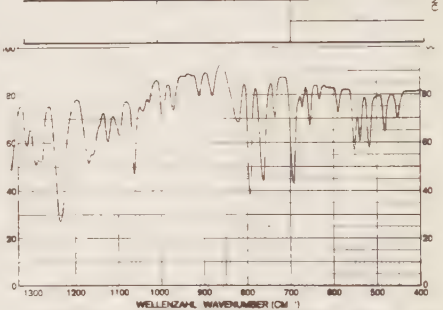
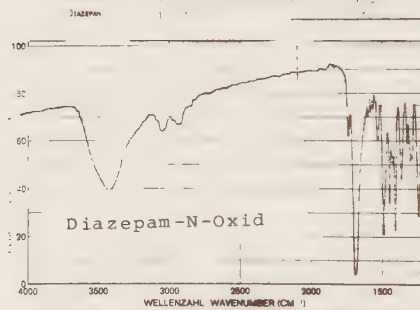
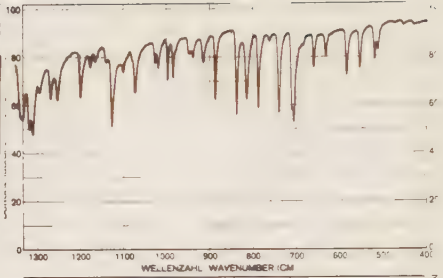
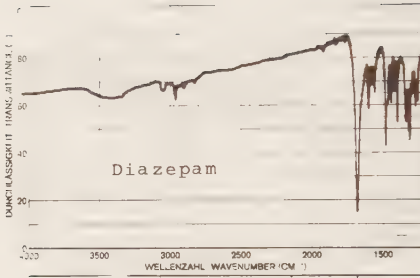


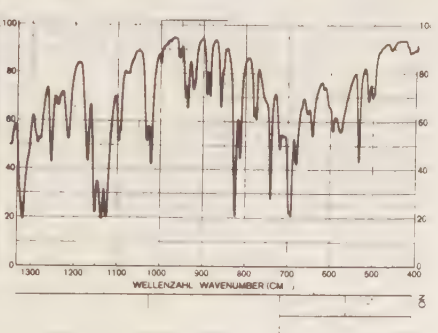
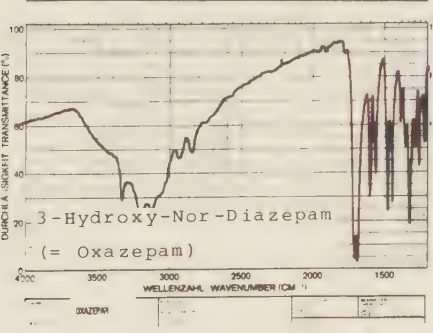
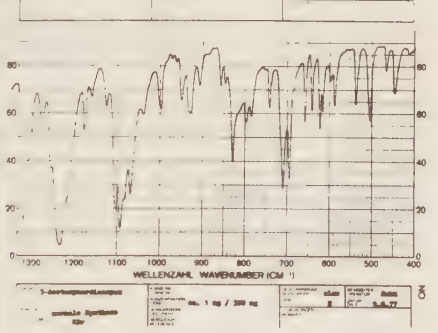
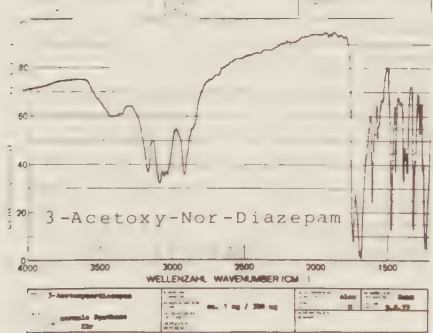
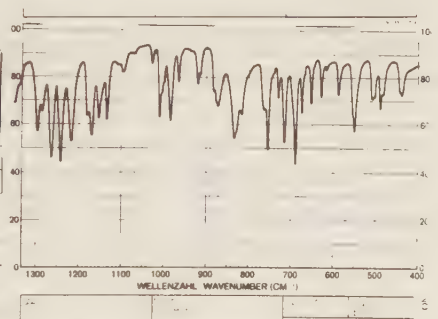
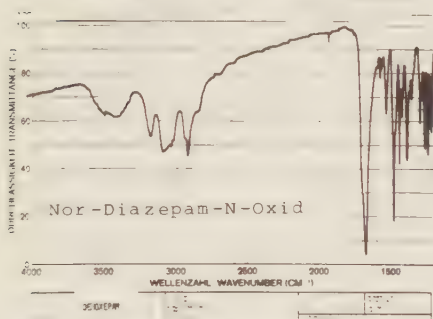
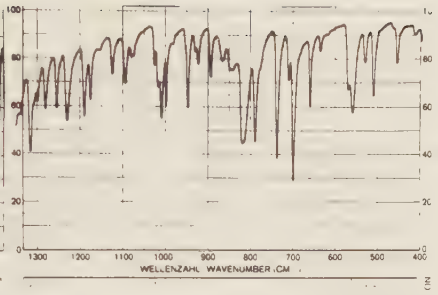
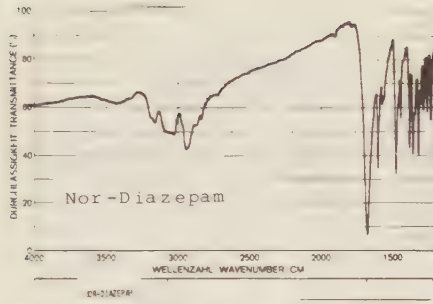












5.0.0.0. Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit

Da eine Zusammenstellung der Ergebnisse bereits nach jedem Einzelkapitel erfolgte, beschränken sich die Ausführungen am Ende der Arbeit auf eine globale Betrachtung und Wertung der erzielten Resultate.

Zunächst soll der analytische Teil der Arbeit behandelt werden: Die Untersuchungen zeigen, daß Derivatisierungen auf der DC-Platte grundsätzlich auf zweifache Weise zu einer Verbesserung der analytischen Aussagekraft führen können. Einerseits kann die Anwendung der Reaktionschromatographie dazu führen, daß eine bestimmte Substanz empfindlicher nachweisbar ist, was etwa durch die Einführung leichter nachweisbarer funktioneller Gruppen erfolgen kann. Auf der anderen Seite ist es aber auch möglich, die Trennbarkeit zweier oder mehrerer Substanzen durch Derivatisierungsschritte zu verbessern, bzw., vgl. Kap. 3.2.2.0.0., überhaupt erst zu ermöglichen. Folgende Anwendungsbeispiele mögen dies verdeutlichen:

Eine entscheidende Verbesserung der Nachweisbarkeit konnte bei den N-1-alkylsubstituierten Benzodiazepinen durch eine photolytische Desalkylierung erzielt werden, da so die äußerst empfindliche und spezifische Reaktion nach Bratton u. Marshall zum Nachweis der entstandenen primären aromatischen Aminobenzophenone anwendbar war, vgl. Kap. 3.1.2.0.0. Ohne Desalkylierungsreaktion bildeten sich bei der sauren Hydrolyse lediglich sekundäre Aminobenzophenone, für deren Nachweis lediglich unspezifischere und vor allem auch weniger empfindliche Reaktionen bekannt sind.

Auch die saure Hydrolyse zahlreicher anderer Pharmaka konnte als brauchbare Derivatisierungsreaktion Einsatz finden, da sich auf diese Weise u.U. auch aus den Metaboliten primäre aromatische Amine gewinnen lassen, vgl. Kap. 3.2.1.0.0.

Die einzelnen Derivatisierungsschritte konnten in vorteilhafter Weise auch im Sinne einer TRT-Technik nach einer Vortrennung in der ersten Laufrichtung zweidimensionaler Dünnschichtchromatogramme vorgenommen werden. Hierbei ergab sich eine weitere Steigerung der Spezifität des Nachweises, da auch danach noch übereinstimmende R_f -Werte nicht nur mit einer, sondern mit zwei oft unterschiedlichen Strukturen zwangsläufig verknüpft waren.

Während sich die erwähnten N-1-alkylierten Benzodiazepine ohne weitere Derivatisierung dünnschichtchromatographisch bequem unterscheiden ließen (bezüglich der R_f -Werte) und die Reaktion auf der DC-Platte (Desalkylierung) lediglich die ansonsten mangelhafte Nachweisbarkeit verbessern sollte, mußte es bei einer Anwendung der reaktionschromatographischen Methode auf die Analytik des Benzodiazepinpaares Clonazepam/Nitrazepam (vgl. Kap. 3.2.2.O.O.) um die Lösung einer gerade konträren Aufgabenstellung gehen, da im Falle von Clonazepam bzw. Nitrazepam ein empfindlicher Nachweis der getrennten Substanz keine besonderen Schwierigkeiten bereitet, hauptsächlich bedingt durch die Tatsache, daß bei der sauren Hydrolyse nach Bratton-Marshall erfassbare primäre aromatische Amine entstehen, vielmehr aber Trennprobleme auftreten, die ihre Ursache in der extrem ähnlichen Struktur haben. Hier konnte erst eine Derivatisierung (Reduktion und Acetylierung auf der DC-Platte) zu einer sicheren Trennung und damit verbundenen Differenzierung führen.

Die folgenden Ausführungen betreffen den präparativen Teil der Arbeit: Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß zahlreiche, darunter auch mehrstufige, Synthesen im Milligramm- bis Mikrogramm-Ansatz durch Reaktionen auf der DC-Platte verifizierbar sind. In einigen Fällen konnte ein weitgehend quantitativer Umsatz erzielt werden. Es muß jedoch

ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß Synthesen auf der DC-Platte keineswegs konventionelle Methoden ersetzen oder gar verdrängen können. Auf der einen Seite ist eine gewisse Begrenzung der Anwendbarkeit in der umsetzbaren Menge gegeben, so daß die Methode auf kleine Ansätze beschränkt bleibt. Allerdings reichen ca. 1 - 2 mg Substanz aus, um die wichtigsten chromatographischen und spektroskopischen Daten (NMR-Spektren wegen des höheren Substanzbedarfes ausgenommen) ermitteln zu können. Andererseits werden einige Reaktionen (z.B. alkalische Hydrolysen in wäßrigen Medien) sicherlich auch vorteilhafter als Lösungsreaktionen durchgeführt, insbesondere, wenn höhere Temperaturen erforderlich sind, da dann mit einer Zerstörung der Sorbensschicht zu rechnen ist.

Für Reaktionen auf der DC-Platte sprechen jedoch folgende eindeutige Vorteile:

- a) Die Methode eignet sich besonders für wertvolle Substanzen (z.B. Neuentwicklungen von Pharmaka oder synthetischen Naturstoffen, die nur in stark begrenzter Menge verfügbar sind), da Verluste, wie sie bei konventionellen Synthesemethoden z.B. durch Extraktionen oder Umkristallisierungen unvermeidbar auftreten, auf ein Minimum beschränkt werden. Hierbei entfällt auch das oft wenig substanzschonende Aufarbeiten der Reaktionslösung (z.B. Ausschütteln aus Lösungen mit stark sauren oder alkalischen pH-Werten, Erhitzen beim Destillieren oder Sublimieren).
- b) Bedingt durch die oft gesteigerte Reaktionsfähigkeit vieler Substanzen in der Sorbensschicht verlaufen einige Reaktionen rascher bei mitunter sogar niedrigeren Temperaturen. Vereinzelt liefern Umsetzungen (z.B. die photolytische Desalkylierung) sogar nur in Form der reaktionschromatographischen Oberflächenreaktion feststellbare und vor allem befriedigende Ausbeuten.

c) Ein besonders wichtiges Anwendungsgebiet der Methode ist in der Möglichkeit der Synthese von Arzneimittelmetaboliten zu sehen. Hier zeigte sich bereits wiederholt die Brauchbarkeit des Verfahrens. Bereits kurz nach der Einführung von Clonazepam (RIVOTRIL^R) bzw. der klinischen Erprobung von Flunitrazepam (vorgesehener Handelsname ROHYPNOL) konnten im Rahmen toxikologischer Notfallanalysen die zum Nachweis erforderlichen Hauptmetaboliten nur in der beschriebenen reaktionschromatographischen Arbeitsweise verfügbar gemacht werden, da zur Synthese lediglich wenige Milligramm Arzneimittelsubstanz vorhanden waren (Extrakt aus Tabletten).

d) Ein weiterer Einsatz für Reaktionen auf der DC-Platte wäre auf dem Gebiet der Synthese radioaktiv markierter Verbindungen vorstellbar, da hierbei meist auch kleine Mengen umgesetzt werden. Vor allem ergäben sich mit Sicherheit positive Konsequenzen für das Abfallbeseitigungsproblem, da die Hauptmenge radioaktiver Substanzen auf der DC-Platte fixiert werden könnte.

Bedingt durch die Konzeption (vgl. Kap. 2.0.0.0.0.), enthält die vorliegende Arbeit weiterhin zahlreiche Untersuchungen zur Analytik und Biotransformation einiger Neuerscheinungen auf dem Arzneimittelmarkt, vgl. Kap. 3.1.1.0.0., 4.2.0.0.0., 3.2.2.0.0., 4.3.0.0.0., 4.4.0.0.0. und 4.5.0.0.0.

Weiterhin wurden im Rahmen der Dissertation Untersuchungen zur Analytik und Biotransformation von Kavain (NEURONIKA^R u.a. Spezialitäten) und Mazindol (TERONAC^R) durchgeführt; die hieraus resultierenden Publikationen sind im Schriftenverzeichnis aufgeführt. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde verzichtet, da sich die Stoffgebiete nicht ohne weiteres unter dem Oberbegriff "Reaktionen auf der Dünnschichtplatte" einheitlich abgehandelt werden können und die Homogenität des Themas darunter möglicherweise gelitten hätte.

6.0.0.0.0. Literaturüberblick zur Analytik der Benzodiazepine.

Die vorliegende Arbeit behandelt insbesondere die Benzodiazepinanalyse. Hierzu wurden umfangreiche Literaturrecherchen durchgeführt, die nachstehend in tabellarischer Form dargestellt sind.

Das Schrifttum zur Analytik der Einzelsubstanzen Nitrazepam bzw. Clonazepam ist bereits in Kap. 3.2.2.2.0. verarbeitet, ebenso die Literatur zur Biotransformation, Pharmakokinetik u.a. (vgl. Kap. 3.2.1.2.0.).

Literatur zur Dünnschichtchromatographie

Diazepam	17, 18, 53, 55, 57, 173, 174, 184, 190, 319, 360, 364, 396, 440, 475, 507,
Chlordiazepoxid	18, 53, 55, 58, 173, 174, 190, 323, 324, 347, 362, 365, 396, 411, 433, 435, 440, 443, 501,
Oxazepam	18, 21, 53, 56, 173, 174, 190, 468,
Medazepam	18, 174, 502,
Lorazepam	18, 21, 63, 65,
Chlorazepat	17, 18,
Prazepam	506,
Flurazepam	427,
Bromazepam	114, 298, 470, 471,
Flunitrazepam	3,

Literatur zur Gaschromatographie

Diazepam	74, 77, 176, 177, 183, 210, 218, 236, 286, 294, 316, 318, 326, 331, 332, 333, 343, 348, 352, 370, 374, 375, 377, 380, 394, 398, 410, 412, 421, 428, 440, 464, 473, 474, 479, 490, 494, 509, 512.
----------	--

Fortsetzung Literatur zur Gaschromatographie

Chlordiazepoxid	183, 362, 374, 377, 432, 440, 479, 490, 513,
Oxazepam	176, 177, 210, 218, 283, 429, 430, 479, 504,
Medazepam	203, 218, 331, 392, 413, 426, 487,
Lorazepam	389, 429, 431, 481, 484,
Chlorazepat	397, 505,
Prazepam	326,
Flurazepam	218, 393, 488,
Bromazepam	114, 200, 298, 350, 482,
Flunitrazepam	83, 224, 351,

Literatur zur Polarographie

Diazepam	189, 334, 345, 346, 364, 372, 402, 403, 444, 452,
Chlordiazepoxid	334, 347, 390, 401, 446, 447, 451,
Oxazepam	371, 385, 453,
Medazepam	445,
Lorazepam	385, 450,
Chlorazepat	315, 449,
Prazepam	448,
Flurazepam	357, 488,
Bromazepam	477, 482,
Flunitrazepam	83,

Literatur zur Photometrie / Kolorimetrie

Diazepam	325, 457, 478,
Chlordiazepoxid	379, 405, 454, 462, 478,
Oxazepam	478,
Medazepam	456,
Flurazepam	104, 510,

Literatur zur Massenspektrometrie

Diazepam	176, 374, 421, 438, 465, 475,
Chlordiazepoxid	374, 438,
Oxazepam	176, 353, 465,
Lorazepam	353,
Flunitrazepam	3,

Literatur zur NMR-Spektroskopie

Diazepam	194, 213, 475,
Chlordiazepoxid	194, 213

Literatur zur Fluorimetrie

Diazepam	178, 440,
Chlordiazepoxid	87, 178, 440, 493,
Oxazepam	178, 349,
Flurazepam	104, 483,

Literatur zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie

vgl. hierzu insbesondere Fr.W.Tank, Dissertation Marburg/
Lahn 1976, weiterhin

Diazepam	222, 425, 463,
Chlordiazepoxid	222,

Literatur zum Radioimmunoassay

Diazepam	356, 455,
Chlordiazepoxid	363,

Analytik der Benzodiazepine in Büchern und anderen
größeren Übersichtsarbeiten

107, 164, 165, 198, 202, 382, 424, 479, 496, 497, 511,

Spezielle Vorschriften zur Analyse von Zubereitungen

54, 201, 208, 339, 348, 369, 376, 377, 381, 387, 388,
395, 400, 406, 415, 467,

Screening-Tests

20, 50, 51, 52, 66, 162, 166, 169, 181, 193, 206, 225,
317, 320, 322, 327, 328, 329, 330, 335, 336, 337, 338,
340, 341, 344, 345, 358, 359, 361, 367, 373, 383, 384,
386, 391, 399, 404, 408, 409, 414, 416, 417, 420, 421,
422, 423, 436, 439, 441, 458, 460, 461, 466, 469, 472,
476, 480, 489, 492, 495, 498, 499, 500, 503, 508,

7.O.O.O.O. Literatur

1. E. Stahl
Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer,
Berlin-Heidelberg-New York, 1967
2. E. Stahl
Arch.Pharm. (Weinheim) 293, 531 (1960)
3. S. Ebel, H. Schütz
unveröffentlichte Ergebnisse
4. S. Ebel, G. Herold
Z.Anal.Chem. 266, 281 (1973)
5. S. Ebel, G. Herold
Dtsch.Lebensm.-Rundschau 70, 133 (1974)
6. J. Kofoed, C. Korczak-Fabierkiewicz, G.H.W. Lucas
Nature (London) 204, 750 (1964)
7. R.A. de Zeeuw, J. Wijsbeek
J.Chromatogr. 48, 222 (1970)
8. M. Wilk, W. Taupp
Z.Naturforsch.B, 24, 16 (1969)
9. M. Wilk, U. Brill
Arch.Pharm. (Weinheim) 301, 282 (1968)
10. M. Wilk, U. Hoppe, W. Taupp, J. Rochlitz
J.Chromatogr. 27, 311 (1967)
11. S. Wassef, T.S. Ma
Mikrochimica Acta (Wien) 1975, 649 (1975)

12. F. Schmidt
Krankenhaus-Apoth. 23, 10 (1973)
13. H. Schütz
Diplomarbeit (Gießen 1972)
14. C. Schütz, H. Schütz
Arch.Toxikol. 28, 286 (1972)
15. C. Schütz, H. Schütz
Dtsch.Apoth.-Ztg. 113, 1559 (1973)
16. C. Schütz, H. Schütz
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 428 (1973)
17. C. Schütz, H. Schütz, Y.D. Ha
Dtsch.Apoth.-Ztg. 113, 1967 (1973)
18. C. Schütz, E. Muskat, D. Post, G. Schewe,
H. Schütz
Z.Anal.Chem. 262, 282 (1972)
19. H. Schütz
Pharmazie 30, 160 (1975)
20. H. Schütz
J.Chromatogr. 94, 159 (1974)
21. C. Schütz, H. Schütz
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10, 528 (1972)
22. H. Schütz, A. Schindler
Z.Anal.Chem. 270, 356 (1974)

23. H.R. Petri
In: Neue Arzneimittel und Spezialitäten
22, (1) 1 (1975)
24. W. Vater, G. Krobeberg, F. Hoffmeister, H.
Kaller, K. Meng, A. Oberdorf, W. Puls, K.
Schloßmann, K. Stoepel
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 1 (1972)
25. K. Hashimoto, N. Taira, S. Chiba, K. Hashi-
moto jr., M. Endoh, M. Kokubun, H. Kokubun,
T. Iijima, T. Kimura, K. Kubota, K. Oguro
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 15 (1972)
26. A. Fleckenstein, H. Tritthart, H.J. Döring,
K.Y. Byon
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 33 (1972)
27. W.K. Raff, F. Kosche, W. Lochner
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 33 (1972)
28. F. Kosche, W.K. Raff, W. Lochner
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 39 (1972)
29. W. Thorn, W. Drexler, B. Müldener
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 56 (1972)
30. F.A. Horster, B. Duhm, W. Maul, H. Medenwald,
K. Patzschke, L.A. Wegner
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 330 (1972)
31. G. Grün, A. Fleckenstein
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 334 (1972)

32. S. Hirakawa, H. Ito, Y. Kondo, I. Watanabe,
K. Hiei, S. Banno, S. Hayase
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 344 (1972)
33. E.K. Follert
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 349 (1972)
34. K. Kochsiek, J. Neubaur
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 353 (1972)
35. A. Loos, M. Kaltenbach
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 358 (1972)
36. M. Kaltenbach, H.J. Becker, G. Kober, A. Loos
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 362 (1972)
37. E. Kimura, G. Mabuchi, H. Kikuchi
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 365 (1972)
38. H.J. Schwarzkopf, J. Schaefer, M. Schöttler,
I. Sedlmeyer, K.-J. Nordmann
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 367 (1972)
39. S. Hayase, S. Hirakawa, S. Hosokawa, N. Mori,
S. Kanyama, M. Iwasa
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 370 (1972)
40. K.W. Schneider, R. Jesse
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 373 (1972)
41. K. Klütsch, P. Schmidt, J. Großwendt
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 377 (1972)
42. T. Kobayashi, Y. Ito, I. Tawara
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 380 (1972)

43. B. Duhm, W. Maul, H. Medenwald, K. Patzschke,
L.A. Wegner
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 42 (1972)
44. H. Medenwald, K. Schloßmann, C. Wünsche
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 53 (1972)
45. S. Ebel, H. Schütz
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 325 (1972)
46. A.C. Bratton, E.K. Marshall jr.
J.biol.Chem. 128, 537 (1939)
47. J. Bäumlér
Toxichem. 1, 5 (1976)
48. J. Bäumlér, S. Rippstein
Chimia 17, 257 (1963)
49. K. Besserer, S. Henzler, E. Kohler, H.J.
Mallach
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 2003 (1971)
50. K.-H. Beyer
Dtsch.Apoth.-Ztg. 111, 1503 (1971)
51. K.-H. Beyer
In: Index der Psychopharmaka (Roche) 195 (1971)
52. S. Ebel, H. Schütz
Dtsch.Apoth.-Ztg. (im Druck)
53. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt, U. Mang
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8, 259 (1970)

54. P. Haefelfinger
J.Chromatogr. 48, 184 (1970)
55. G. Kamm, R. Baier
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 213 (1969)
56. G. Kamm, R. Kelm
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1659 (1969)
57. H.J. Langner
Z.Anal.Chem. 202, 28 (1964)
58. O. Pribilla
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 723 (1964)
59. O. Pribilla
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 1148 (1965)
60. J. Rieder
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 1134 (1965)
61. H. Sawada, K. Shinohara
Arch.Toxikol. 27, 71 (1970)
62. H. Sawada, K. Shinohara
Arch.Toxikol. 28, 214 (1971)
63. C. Schütz, H. Schütz
Arch.Toxikol. 30, 183 (1973)
64. C. Schütz, H. Schütz
Beitr.gerichtl.Med. 31, 330 (1973)
65. C. Schütz, E. Muskat, H. Schütz
Beitr.gerichtl.Med. 33, 224 (1975)

66. H.M. Stevens, R.W. Jenkins
J.forens.Sci.Soc. 11, 183 (1971)
67. R.F. Weist
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 87 (1968)
68. I. Zingales
J.Chromatogr. 31, 405 (1967)
69. S. Ebel, A. Hornitschek, H. Schütz
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) (im Druck)
70. F. Thoma
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16, 771 (1966)
71. M.A. Schwartz, B.A. Koechlin, E. Postma, S.
Palmer, G. Krol
J.Pharmacol.Exp.Ther. 149, 423 (1965)
72. J.A.F. de Silva, B.A. Koechlin, G. Bader
J.Pharm.Sci. 55, 692 (1966)
73. S.A. Kaplan, M.L. Jack, K. Alexander, R.E.
Weinfeld
J.Pharm.Sci. 62, 1789 (1973)
74. G. Jommi, P. Manito, M.A. Silanos
Arch.Biochem.Biophys. 108, 344 (1964)
75. H.W. Ruelius, J.M. Lee, H.E. Alburn
Arch.Biochem.Biophys. 111, 376 (1965)
76. M.A. Schwartz, E. Postma
Biochem.Pharmacol. 17, 2443 (1968)

77. J.A.F. de Silva, M.A. Schwartz, V. Stefanovic,
J. Kaplan, L. D'Arconte
Analyt.Chem. 36, 2099 (1964)
78. M.A. Schwartz, B.A. Koechlin, G. Krol
Fed.Proc. 22, 367 (1963)
79. J. Rieder, G. Rentsch
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 1545 (1968)
80. F.J. DiCarlo, J.P. Viau, J.E. Epps, L.J.
Haynes
Clin.Pharmacol.Therapeut. 11, 890 (1970)
81. J.P. Viau, J.E. Epps, F.J. DiCarlo
Biochem.Pharmacol. 21, 563 (1972)
82. S.A. Kaplan, K. Alexander, M.L. Jack, C.V.
Puglisi, J.A.F. de Silva, T.L. Lee, R.E.
Weinfeld
J.Pharm.Sci. 63, 527 (1974)
83. J.A.F. de Silva, C.V. Puglisi, N. Munno
J.Pharm.Sci. 63, 520 (1974)
84. M.A. Schwartz, S. Kolis
(unpublished data on file)
85. L.O. Randall, W. Schallek, G.A. Heise, E.F.
Keith, R.E. Bagdon
J.Pharmacol.exp.Ther. 129, 163 (1960)
86. B.A. Koechlin, M.A. Schwartz
Fed.Proc. 20, 171 (1961)

87. B.A. Koechlin, L. D'Arconte
Analytic.Biochem. 5, 195 (1963)
88. H. Gänshirt
In: E. Stahl, Dünnschichtchromatographie,
2. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York,
Springer 1967
89. M.A. Schwartz, E. Postma
J.pharmac.Sci. 55, 1358 (1966)
90. J. Bäumler, S. Rippstein
Helv.chim.Acta 44, 2208 (1961)
91. H. Pelzer, D. Maass
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1652 (1969)
92. J.A. Knowles, H.W. Ruelius
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 687 (1972)
93. J. Steidinger, E. Schmidt
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1232 (1970)
94. S.F. Sisenwine, C.O. Tio, S.R. Shrader, H.W.
Ruelius
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 682 (1972)
95. H.B. Kimmel, S.S. Walkenstein
J.Pharm.Sci. 56, 538 (1967)
96. S.S. Walkenstein, R. Wiser, C.H. Cudmundsen,
H.B. Kimmel, R.A. Corradino
J.Pharm.Sci. 53, 1181 (1964)

97. D. Waldi
In: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte; hrsg. E. Graf und Fr. R. Preuß, Bd. II, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1966
98. R. Raveux, P. Gros
Bulletin de Chimie thérapeutique 481 (1969)
99. R. Raveux, P. Gros, J. Navarro
Bulletin de Chimie thérapeutique 357 (1969)
100. S. Ebel, H. Schütz
Mikrochimica Acta (in Vorbereitung)
101. G. Gräfe, W. Schmeling
Dtsch.Apoth.-Ztg. 116, 163 (1976)
102. M.A. Schwartz, F.M. Vane, E. Postma
J.Med.Chem. 11, 770 (1968)
103. M.A. Schwartz, E. Postma
J.Pharm.Sci. 59, 1800 (1970)
104. J.A.F. de Silva, N. Stojn
J.Pharm.Sci. 60, 1303 (1971)
105. S.A. Kaplan, J.A.F. de Silva
J.Pharm.Sci. 62, 1932 (1973)
106. M. Geldmacher-von Mallinckrodt
Forensische Toxikologie. In: Gerichtliche Medizin Bd. 2, hrsg. von B. Mueller. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1975

107. M. Geldmacher-von Mallinckrodt
Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinisch-
chemischen Laboratorium. S. 155
Thieme, Stuttgart: 1976
108. E. Vidic, E. Klug
Z.Rechtsmedizin 76, 283 (1975)
109. J. Bäumler, H. Brandenberger
Z.Rechtsmedizin 76, 159 (1975)
110. K.-H. Beyer
Biotransformation der Arzneimittel. Stutt-
gart: Wiss. Verlagsges. 1975
111. S. Pfeifer
Biotransformation von Arzneimitteln (in Vor-
bereitung) VEB Verlag Volk u. Gesundheit.
Berlin: 1976
112. J. Raaflaub, J. Speiser-Courvoisier
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 1841 (1974)
113. M.A. Schwartz, E. Postma, S.J. Kolis, A.S.
Leon
J.Pharm.Sci. 62, 1776 (1973)
114. J.A.F. de Silva, J. Kaplan
J.Pharm.Sci. 55, 1278 (1966)
115. P. Gros, R. Raveux
Bulletin de Chimie thérapeutique 4, 312 (1969)
116. E. Eschenhof
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 390 (1973)

117. J.A. Knowles, W.H. Comer, H.W. Ruelius
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1055 (1971)
118. K.-H. Beyer, W. Sadée
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1929 (1969)
119. J. Rieder
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 212 (1973)
120. B.B. Brodie, J. Axelrod
J.Pharmacol.exp.Ther. 94, 29 (1948)
121. B.B. Brodie, J. Axelrod
J.Pharmacol.exp.Ther. 97, 58 (1949)
122. H. Büch, H. Häuser, K. Pfleger, W. Rüdiger
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 4, 288 (1966)
123. H. Büch, K. Pfleger, W. Rüdiger
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 5, 110 (1967)
124. P. Glogner, A. Ermert
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 636 (1970)
125. L.A. Greenberg, D. Lester
J.Pharmacol.exp.Ther. 88, 87 (1947)
126. A. Klutch, M. Bordun
J.Pharm.Sci. 57, 524 (1968)
127. D. Lester, L.A. Greenberg
J.Pharmacol.exp.Ther. 90, 68 (1947)
128. W. Rüdiger, H. Büch
Arch.exp.Path.Pharmac. 251, 107 (1965)

129. B.B. Brodie, J. Axelrod
J.Pharmacol.exp.Ther. 99, 171 (1950)
130. L. Fleischmann
Pharmaceutica Acta Helvetiae 48, 192 (1973)
131. M. Geldmacher-von Mallinckrodt, J.H. Geld-
macher, K. Müller
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 9, 427 (1971)
132. J. Halberkann, F. Fretwurst
Zschr.physiol.Chem. 285, 97 (1950)
133. M. Jaffé
Ber.dtsch.chem.Ges. 34, 2737 (1901)
134. M. Jaffé
Ber.dtsch.chem.Ges. 35, 2891 (1902)
135. E. Klug
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 201 (1970)
136. L. Knorr
Liebigs Ann.Chem. 238, 137 (1887)
137. Fr.R. Preuß, K.-M. Voigt
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 741 (1965)
138. R. Schüppel, K. Soehring
Pharm.ActaHelv. 40, 105 (1965)
139. R.T. Schillings, S.R. Shrader, H.W. Ruelius
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1059 (1971)
140. M. Geldmacher-von Mallinckrodt, A. Herrmann
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 7, 34 (1968)

141. J. Steidinger, E. Schmidt
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1232 (1970)
142. J. Vecerkova, B. Kakac, B. Vecerek, K. Kac1
Pharmazie 21, 676 (1966)
143. J. Vecerkova, B. Kakac, B. Vecerek, M. Ledvina
Pharmazie 22, 30 (1967)
144. L.F. Prescott, M. Sansur, W. Levin, A.H.
Conney
Clin.Pharmacol.Ther. 9, 605 (1968)
145. H. Büch, K. Pfleger, W. Rummel
Biochem.Pharmac. 16, 2247 (1967)
146. J.N. Smith, R.T. Williams
Biochem.J. 44, 239 (1949)
147. H. Baader, S. Girgis, M. Kiese, H. Menzel,
L. Skrobot
Arch.exp.Path.Pharmak. 241, 317 (1961)
148. M. Kiese, H. Menzel
Arch.exp.Path.Pharmak. 242, 551 (1962)
149. A. Klutch, M. Harfenist, A.H. Conney
J.med.Chem. 9, 63 (1966)
150. V. Ullrich, D. Hey, Hj. Staudinger, H. Büch,
W. Rummel
Biochem.Pharmac. 16, 2237 (1967)
151. Hj. Staudinger, V. Ullrich
Biochem.Z. 339, 491 (1964)

152. H. Büch, W. Gerhards, K. Pfleger, W. Rüdiger,
W. Rummel
Biochem.Pharmac. 16, 1585 (1967)
153. J. Axelrod
Biochem.J. 63, 634 (1956)
154. K. Krisch
Biochem.Z. 337, 531 (1963)
155. K. Krisch
Biochem.biophys.Acta 122, 265 (1966)
156. F. Pechtold
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 972 (1964)
157. B. Gradnik, L. Fleischmann
Pharmac.ActaHelv. 48, 144 (1973)
158. E. Oettinger
Diss. Erlangen-Nürnberg 1970
159. S. Goenechea
Z.klin.Chem. 7, 346 (1969)
160. H.G. Kampffmeyer
Europ.J.Clin.Pharmacol. 3, 113 (1971)
161. H.R. Petri
In: Neue Arzneimittel und Spezialitäten
23, (4) 48 (1976)
162. H. Auterhoff, K.-A. Kovar
Identifizierung von Arzneistoffen, 2. neu-
bearb. u. erw. Aufl. (1973). Wiss. Verlags-
ges. Stuttgart

163. E.G.C. Clarke
Isolation and Identification of Drugs. The
Pharmaceutical Press, London (1971)
164. J.M. Clifford, W.F. Smyth
The Analyst 99, 241 (1974)
165. S. Ebel
Handbuch der Arzneimittel-Analytik. S. 281-4,
Verlag Chemie, Weinheim: 1977
166. C. Gardner-Thorpe, M.J. Parsonage, C.
Toothill
Clin.Chim.Acta 35, 39 (1971)
167. J. Rieder, G. Wendt
In: "The Benzodiazepines" by S. Garattini,
E. Mussini, L.O. Randall. Eds., Raven Press
New York, N.Y. 1973, pp. 99-127
168. H. Schütz
In: Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxi-
kologie und Anleitung zur Ausmittelung der
Gifte, Bd. I, 2 (1. Hälfte), hrsg. von Fr.
R. Preuß, Göttingen: Vandenhoeck & Rup-
recht 1976
169. E. Vidic
Arch.Toxikol. 27, 19 (1970)
170. H. Schütz
Clonazepam. In: 168
171. H. Sawada, K. Shinohara
The Journal of Hygienic Chemistry 16, 318 (1970)

172. S. Lauffer, E. Schmidt, F. Weist
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1965 (1969)
173. E. Röder, E. Mutschler, H. Rochelmeyer
Z.Anal.Chem. 244, 45 (1969)
174. S. Ebel, H. Kußmaul
Arch.Pharmaz. 307, 230 (1974)
175. G.P. Beharrell, D.M. Hailey, M.K. McLaurin
J.Chromat. 70, 45 (1972)
176. A. Forgione, P. Martelli, F. Marcucci,
R. Fanelli, E. Mussini, G.C. Jommi
J.Chromatogr. 59, 163 (1971)
177. F. Marcucci, R. Fanelli, E. Mussini
J.Chromatogr. 37, 318 (1968)
178. J. Braun, G. Caille, E.A. Martin
Canad.J.Pharmacol.Sci. 3, 65 (1968)
179. J. Rieder
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 207 (1973)
180. K.-H. Beyer, W. Sadée
Arch.Pharmaz. 302, 152 (1969)
181. A. Heyndrickx, A. de Leenheer
Farmaceutisch tijdschrift voor België 48,
1 (1971)
182. R.D. Maier, K.H. Wehr
Arch.Toxikol. 32, 341 (1974)

183. M.R. Möller, K.H. Witzmann, D. Tausch
Beitr.gerichtl.Med. XXXI, 259 (1973)
184. S.L. Tompsett
J.clin.Path. 21, 366 (1968)
185. L.O. Randall, W. Schallek, C. Scheckel,
R.E. Bagdon, R.E. Rieder
Schweiz.med.Wschr. 95, 334 (1965)
186. J.E. Blum, W. Haefely, M. Jalfre, P. Polc,
K. Schärer
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 377 (1973)
187. S. Ebel, G. Herold
Z.Anal.Chem. 266, 281 (1973)
188. S. Ebel, G. Herold
Deutsche Lebensmittel-Rundschau 70, 133 (1974)
189. J. Barrett, W.F. Smyth, J.P. Hart
J.Pharm.Pharmac. 26, 9 (1974)
190. H.D. Beckstead, S.J. Smith
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 529 (1968)
191. K.-H. Beyer, W. Sadée
Arch.Pharm. (Weinheim) 300, 667 (1967)
192. K.-H. Beyer, W. Sadée
Pharmaz.Ztg. 112, 1394 (1967)
193. K.-H. Beyer, W. Sadée
Dtsch.Apoth.-Ztg. 109, 312 (1969)

194. W. Bley, P. Nuhn, G. Benndorf
Arch.Pharm. (Weinheim) 301, 444 (1968)
195. J.P. Cano, J. Catalin, A. Viala, J. Roger,
C.A. Tassinari, C. Dravet, H. Gastrauf
Eur.J.Toxikol.Environ.Hyg. 9, 215 (1976)
196. A.M. Diab
Pharmazie 30, 746 (1975)
197. N. Gallo, V.D. Bianco, S. Doronzo, P.D.
Laforgia
Experientia 30, 459 (1974)
198. S. Garattini, E. Mussini, L.O. Randall
The Benzodiazepines, Raven Press, New York
1973
199. S. Garattini, F. Marcucci, E. Mussini
DrugMetab.Rev. 1, 291 (1972)
200. M.S. Greaves
Clin.Chem. 20, 141 (1974)
201. O.L. Grom, V.S. Komar, N.S. Ladizhinskaia
Farm.2.H. 1976, 82
202. D.M. Hailey
J.Chromatogr. 98, 527 (1974)
203. D.M. Hailey, A.G. Howard, G. Nickless
J.Chromatogr. 100, 49 (1974)
204. S. Halvorsen, E. Jacobsen
Anal.Chim.Acta 59, 127 (1972)

205. K.M. Jensen
J.Chromatogr. 111, 389 (1975)
206. E. Kassau
Dtsch.Apoth.-Ztg. 113, 1532 (1973)
207. A. Kobiela-Krzyżanowska
Pharmazie 31, 649 (1976)
208. P. Marcu, I. Grecu
Pharmazie 31, 167 (1976)
209. W. Mayer, S. Erbe, R. Voigt
Pharmazie 27, 32 (1972)
210. A.C. Moffat
J.Chromatogr. 113, 69 (1975)
211. J. Naestoft, N.E. Larsen
J.Chromatogr. 93, 113 (1974)
212. J. Naestoft, M. Lund, N.E. Larsen, E. Hvidberg
Acta neurol.scand. 49, 103 (1973)
213. P. Nuhn, W. Bley
Pharmazie 22, 532 (1967)
214. H. Oelschläger, J. Volke, G.T. Lim
Arch.Pharm. 298, 213 (1965)
215. H. Oelschläger, J. Volke, G.T. Lim
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17, 637 (1967)

216. H. Oelschläger, J. Volke, G.T. Lim, U. Frank
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16, 82 (1966)
217. J.S. Oliver, H. Smith
Forensic Sci. 4, 183 (1974)
218. B.E. Pape
Clin.Chem. 22, 739 (1976)
219. G.J.G. Parry, D.G. Ferry
J.Chromatogr. 128, 166 (1976)
220. H. Sawada, A. Hara
Experientia 32, 987 (1976)
221. H. Sawada, K. Shinohara
J.pharm.Soc.Japan 91, 508 (1971)
222. C.G. Scott, P. Bommer
J.Chromatog.Sci. 8, 446 (1970)
223. D. Shapcott, B. Lemieux
Clin.Biochem. 8, 283 (1975)
224. J.A.F. de Silva, I. Bekersky
J.Chromatogr. 99, 447 (1974)
225. J.A.F. de Silva, I. Bekersky, C.V. Puglisi,
M.A. Brooks, R.E. Weinfeld
Anal.Chem. 48, 10 (1976)
226. O. Sjöe, E.F. Hvidberg, J. Naestoft, M. Lund
Eur.J.Clin.Pharmacol. 8, 249 (1975)

227. G.M. Wassel, A.M. Diab
Pharmazie 28, 790 (1973)
228. D.J. Weber
J.Pharm.Sci. 61, 1797 (1972)
229. F.-W. Tank
Dissertation Marburg/Lahn 1976
230. S. Agurell, A. Berlin, H. Ferngren, B. Hellstroem
Epilepsia 16, 277 (1975)
231. E.S. Baird, D.M. Hailey
Brit J.Anesthesia 45, 546 (1973)
232. P. Bertagni
J.pharmac.Sci. 61, 965 (1972)
233. P. Berté
Farmaco (Pavia), Ediz.prat. 25, 177 (1970)
234. P. Berté
Arch.int.Pharmacodynam.Thérap. 182, 182 (1969)
235. P. Berté
Arch.int.Pharmacodynam.Thérap. 173, 377 (1968)
236. J.-G. Besner
Rev.Canad.Biol. 32, 241 (1973)
237. M. Brunaud, J. Navarro, J. Salle, G. Siou
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 123 (1970)

238. H. Cardauns, R. Iffland
Arch.Toxikol. 31, 147 (1973)
239. C.B. Coutinho
Xenobiotica 3, 681 (1973)
240. C.B. Coutinho
Xenobiotica 1, 287 (1970)
241. J.E. Cree
Brit.med.J. 4, 251 (1973)
242. F.J. DiCarlo, J.P. Viau
J.pharmac.Sci. 59, 322 (1970)
243. F.J. DiCarlo, C. Crew, M.D. Melgar, L.J. Haynes
J.pharmac.Sci. 58, 960 (1969)
244. F.J. DiCarlo, J.P. Viau, J.E. Epps, L.J. Haynes
Ann.N.Y.Acad.Sci. 179, 487 (1971)
245. J. Ditt, R. Pauer
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, 653 (1965)
246. R. Dixon, M.A. Brooks, E. Postma, M.R. Hackmann, S. Spector, J.D. Moore, M.A. Schwartz
Clin.Pharmacol.Ther. 20, 450 (1976)
247. K. Dretchen
Anesthesiology 34, 463 (1971)
248. J.W. Dundee, M. Isaac
Brit.J.Pharmacol. 39, 199 (1970)

249. R. Erkkola
Acta obstet.gynecol.Scand. 53, 135 (1974)
250. R. Erkkola, J. Kanto, R. Sellman
Brit.med.J. 3, 472 (1974)
251. K. Ettler
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 988 (1969)
252. R. Fanelli, F. Maruccci, E. Mussini, S. Garattini
Eur.J.Pharmacol. 7, 307 (1969)
253. S.A. Feldmann, B.E. Crawley
Brit.med.J. 2, 336 (1970)
254. S.A. Feldmann, B.E. Crawley
Brit.med.J. 1, 691 (1970)
255. H. Fujimori
Psychopharmacologia 7, 374 (1965)
256. P. Glogner, N. Heni, L. Herkel, G. Höfer
Dtsch.med.Wschr. 98, 2472 (1973)
257. M.I. Gluckmann
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1049 (1971)
258. P. Gold-Aubert, J. Lacroix
Méd.et Hyg. 1970, 855
259. D.J. Greenblatt, R.I. Shader, J. Koch-Weser
In: L.A. Gottschalk, S. Merlis, Ed. Pharmacokinetics of Psychoactive Drugs. New York, Spectrum Publications, 1976

260. D.J. Greenblatt, R.I. Shader, J. Koch-Weser,
K. Franke
Psychopharmacol.Bull. 11, 34 (1975)
261. D.J. Greenblatt, R.T. Schillings, A.A.
Kyriakopoulos, R.I. Shader, S.F. Sisenwine,
J.A. Knowles, H.W. Ruelius
Clin-Pharmacol.Ther. 20, 329 (1976)
262. G. de Groot, R.A.A. Maes, P. Defoort, M.
Thiery
IRCS Med.Sci. 3, 594 (1975)
263. D.M. Hailey, J.E. Cree, J. Meyer
Brit.med.J. 2, 670 (1974)
264. M. Hasegawa, H. Takai, I. Matsubara
J.pharmac.Sci. 64, 1732 (1975)
265. L. Hillestad, T. Hansen, H. Melsom
Clin.Pharmacol.Ther. 16, 479 (1974)
266. S. Hokari
Boll.Soc.ital.Biol.Sperim. 43, 861 (1967)
267. L.E. Hollister
Clin.Pharmacol.Ther. 7, 142 (1966)
268. J.E. Idänpään-Heikkilä, P.I. Jouppila, J.O.
Puolakka, M.S. Vorne
Amer.J.Obstet.Gynecol. 109, 1011 (1971)
269. D.I. Jeffery, M.F. Whitfield
Brit.med.J. 4, 719 (1974)

270. H. Jick
New England J.Med. 288, 277 (1973)
271. G. Jommi, P. Manitto, M.A. Silanos
Arch.Biochem.Biophys. 108, 562 (1964)
272. L. Kangas, J. Kanto, J. Forsstroem, E. Isalo
Clin.Nephrol. 5, 114 (1976)
273. J. Kanto
Ann.clin.Res. 5, 575 (1973)
274. J. Kanto
Brit.med.J. 1, 641 (1974)
275. J. Kanto
Int.J.Clin.pharmacol.biopharm. 12, 427 (1975)
276. S.A. Kaplan, M.L. Jack, R.E. Weinfeld, W.
Glover, L. Weissmann, S. Cotler
J.Pharmacokinet.Biopharm. 4, 1 (1976)
277. E. van der Kleijn
Arch.int.pharmacodyn. 178, 193 (1969)
278. E. van der Kleijn
Arch.int.pharmacodyn. 179, 225 (1969)
279. E. van der Kleijn
Arch.int.pharmacodyn. 182, 433 (1969)
280. E. van der Kleijn, J.M. Van Rossum, E.T.J.M.
Muskens, N.V.M. Rijntes
Acta Pharm.Toxicol. 29, 110 (1973)

281. B.A. Koechlin, M.A. Schwartz, G. Krol, W. Oberhansli
J.Pharm.Exp.Ther. 148, 399 (1965)
282. J. Kvetina
J.Pharm.Pharmacol. 20, 807 (1968)
283. H.J. Mallach, A. Moosmayer, K. Gottwald, M. Staak
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 1840 (1975)
284. L. Manzo
Boll.chim.farmac. 108, 19 (1969)
285. F. Marcucci
Biochem.Pharmacol. 22, 3051 (1973)
286. F. Marcucci, R. Fanelli, E. Mussini, S. Garattini
Eur.J.Pharmacol. 7, 307 (1969)
287. F. Marcucci, R. Fanelli, M. Prova, P.L. Morselli
Eur.J.Pharmacol. 4, 464 (1968)
288. F. Marcucci, E. Mussini
Brit.J.Pharmacol. 34, 667 (1968)
289. F. Marcucci, E. Mussini, R. Fanelli, S. Garattini
Biochem.Pharmacol. 19, 1847 (1970)
290. F. Marcucci, E. Mussini, A. Guaitani, R. Fanelli, S. Garattini
Eur.J.Pharmacol. 16, 311 (1971)

291. A. Moosmayer, H.J. Mallach, M. Staak
Beitr.gerichtl.Med. 34, 85 (1976)
292. W. Müller, U. Wollert
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. 280,
229 (1973)
293. E. Mussini, F. Marcucci, R. Fanelli, S.
Garattini
Biochem.Pharmacol. 20, 2529 (1971)
294. E. Mussini, F. Marcucci, R. Fanelli, S.
Garattini
Chem.-Biol. Interactions 5, 73 (1972)
295. G.F. Placidi, G.B. Cassano
Int.J.Neuropharmacol. 7, 383 (1968)
296. L.O. Randall, W. Schallek, C. Scheckel, R.
Banziger, A. Boris, R.A. Moe, R.E. Bagdon,
M.A. Schwartz, G. Zbinden
Schweiz.med.Wschr. 93, 794 (1963)
297. L.O. Randall, C.L. Scheckel, R.F. Banziger
Curr.Therap.Res. 7, 590 (1965)
298. H. Sawada, A. Hara
J.Pharm.Soc.Jpn. 95, 430 (1975)
299. H.-J. Schwandt, K.-H. Beyer
Dtsch.Apoth.-Ztg. 117, 1680 (1972)
300. D.E. Schwartz, M. Vecchi, A. Ronco, K. Kaiser
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 16, 1109 (1966)

301. M.A. Schwartz, J.J. Carbone
Biochem.Pharmacol. 19, 343 (1970)
302. M.A. Schwartz, E. Postma
J.Pharm.Sci. 61, 123 (1972)
303. M.A. Schwartz, E. Postma, Z. Gaut
J.Pharm.Sci. 60, 1500 (1971)
304. M.A. Schwartz, E. Postma, S.J. Kolis
J.pharmac.Sci. 60, 438 (1971)
305. M.A. Schwartz, V.M. Vane, E. Postma
Biochem.Pharmacol. 17, 965 (1968)
306. M.A. Schwartz, V.M. Vane, E. Postma
J.Pharm.Sci. 59, 1800 (1970)
307. D.R. Stanski, D.J. Greenblatt, A. Selwyn,
R.I. Shader, K. Franke, J. Koch-Weser
Clin.Pharmacol.Ther. 20, 571 (1976)
308. L.H. Sternbach
Angew.Chem. 83, 70 (1971)
309. E.S. Vesell
Pharmacology 7, 197 (1972)
310. A. Viala, J.P. Cano, C. Dravet, C.A. Tassinari,
J. Roger
Psychiatr.Neurol.Neurochir. 74, 153 (1971)
311. J.P. Viau
Federat.Proc. 30, 225 (1971)

312. J.P. Viau, J.E. Epps, F.J. DiCarlo
J.pharmac.Sci. 62, 641 (1973)
313. I. Zingales
J.Chromatogr. 34, 44 (1968)
314. I.A. Zingales
J.Chromatogr. 75, 55 (1973)
315. C.W. Abruzzo, M.A. Brooks, S. Cotler,
S.A. Kaplan
J.Pharmacokinet.Biopharm. 4, 29 (1976)
316. S. Agurell, A. Berlin, N. Kallberg, L.O.
Boreus
Dtsch.Apoth.-Ztg. 111, 1705 (1971)
317. A. Alha, I. Lukari
Scand.J.Clin.Invest. 23, 7 (1969)
318. K. Andrew, R.N. Gupta, P.M. Keane
Clin.Chem. 18, 1039 (1972)
319. S. Arizan, R. Simionovici, V. Voinov
Pharmazie 24, 746 (1969)
320. D. Armstrong, S. Most
Clin.Chem. 18, 706 (1972)
321. E. Arnold
Acta Pharmacol.Toxicol. (KBH) 36, 335 (1975)
322. W. Arnold
Z.Kreislaufforschung 60, 140 (1971)

323. J. Bäumler
Chimia 17, 247 (1963)
324. J. Bäumler, A.L. Brault, J. Im Obersteg
Schweiz.Arch.Tierheilk. 106, 346 (1964)
325. T.R. Baggi, S.N. Mahajan, G.R. Rao
J.Assoc.Off.Anal.Chem. 58, 875 (1975)
326. E.S. Baird, D.M. Hailey, S. Malcolm
Clin.Chim.Acta 48, 105 (1973)
327. B.R. Ballinger, E. Simpson, M.J. Stewart
Acta Psychiatr.Scand. 50, 619 (1974)
328. J. Barrett
Chem.Eng.News 49, 13 (1971)
329. M.L. Bastos, G.E. Kananen, R.M. Young,
J.R. Monforte, I. Sunshine
Clin.Chem. 16, 931 (1970)
330. G. Bellemonte
Boll.Soc.ital.biol.Sper. 43, 460 (1967)
331. G. Belvedere, G. Tognoni, A. Frigerio, P.L.
Morselli
Anal.Lett. 551 (1972)
332. A. Berlin, B. Siwers, S. Agurell, A. Hiort,
F. Sjöquist, S. Ström
Clin.Pharmacol.Ther. 13, 733 (1972)
333. H. Berninger, R. Grönnagel, S. Mall, M.R.
Möller
Beitr.gerichtl.Med. 33, 185 (1975)

334. D.J. Berry
Clin.Chim.Acta 32, 235 (1971)
335. D.J. Berry, J. Grove
J.Chromatogr. 80, 205 (1973)
336. J. Bertram
Dtsch.Apoth.-Ztg. 114, 1395 (1974)
337. K.-H. Beyer
Mitt.Deut.Pharm.Ges. 36, 177 (1966)
338. K.-H. Beyer
Dtsch.Apoth.-Ztg. 105, 1529 (1965)
339. E. Eich, H. Geissler, E. Mutschler, W.
Schunack
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1895 (1969)
340. U. Boerner, S. Abbott, J.C. Eidson, C.E.
Becker, H.T. Horio, K. Loeffler
Clin.Chim.Acta 49, 445 (1973)
341. G. Bohn
Mitt.GDCH-Fachgr.Leb.Chem.Gerichtl.Chem.
24, 185 (1970)
342. P. Bommer, H. Moser, W. Stichler, P. Trim-
born, W. Vetter
Z.Naturforsch. 31, 111 (1976)
343. H.E. Booker, G.G. Celesia
Arch.Neurol. 29, 191 (1973)

344. J.R. Broich, D.B. Hoffmann, S. Andryauskas,
L. Galante, C.J. Umberger
J.Chromatogr. 60, 95 (1971)
345. M.A. Brooks, J.J. Bel Bruno, J.A.F. de Silva,
M.R. Hackman
Anal.Chim.Acta 74, 367 (1975)
346. M.A. Brooks, M.R. Hackman
Anal.Chem. 47, 2059 (1975)
347. M.A. Brooks, J.A.F. de Silva, M.R. Hackman
Amer.Lab. 5, 23 (1973)
348. B. Byers, G. Jordan
J.Gas Chromatogr. 2, 304 (1964)
349. G. Caille, J. Braun, D. Gravel, R. Plourde
Can.J.Pharm.Sci. 8, 42 (1973)
350. J.P. Cano, A.M. Baille, A. Viala
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 1012 (1975)
351. J.P. Cano, J. Guintrand, C. Aubert, A. Viala
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 27, 338 (1977)
352. J.P. Cano, L. Vignoli, A. Viala
Ann.pharm.franc. 25, 697 (1967) und
ibid. 25, 821 (1967)
353. T.T.L. Chang
Experientia (Basel) 29, 653 (1973)
354. J. Christiansen
Ugeskr.Laeg. 127, 1079 (1965)

355. J.M. Clifford, W.F. Smyth
Z.Anal.Chem. 264, 149 (1973)
356. R. Cleeland, J. Christenson, M. Usategui-Gomez, J. Heveran, R. Davis, E. Grunberg
Clin.Chem. 22, 712 (1976)
357. J.M. Clifford, M.R. Smyth, W.F. Smyth
Z.Anal.Chem. 272, 198 (1974)
358. J. Cochin, J.W. Daly
J.Pharmacol.Exp.Ther. 139, 160 (1963)
359. J.P. Comer, I. Comer
J.Pharmac.Sci. 56, 413 (1967)
360. C.B. Coutinho
Biochem.Pharmacol. 19, 363 (1970)
361. B. Davidow, N.L. Petri, B. Quame
Amer.J.Clin.Pathol. 50, 714 (1968)
362. W.R. Dixon, M.A. Brooks, E. Postma, M.R. Hackman, M.A. Schwartz
Amer.Soc.Pharmacol.Exp.Ther., FASEB Annual Meeting, Atlantic City, April, 1974
363. W.R. Dixon, J. Earley, E. Postma
J.Pharm.Sci. 64, 937 (1975)
364. R. Dugal, E. Caille, S.F. Cooper
Union Med.Can. 102, 2491 (1973)
365. S. Ebel, H. Kussmaul
Z.Anal.Chem. 269, 10 (1974)

366. S. Ebel, H. Schütz
im Druck
367. H. Egg
Arch.Pharm. (Weinheim) 309, 433 (1976)
368. H. Ehrsson, A. Tilly
Anal.Lett. 6, 197 (1973)
369. S. El Gandi, W. Kisser, G. Machata
Mikrochim.Acta 1965, 125
370. R. Erkkola, L. Kangas, A. Pekkarinen
Acta Obstet.Gynaecol.Scand. 52, 167 (1973)
371. F.R. Fazzari, O.H. Riggleman
J.Pharm.Sci. 58, 1530 (1969)
372. J. Fidelus, M. Zietek, A. Mikolajek, Z.
Grochowska
Mikrochim.Acta 1972, 84
373. B.S. Finkle, E.J. Cherry, D.M. Taylor
J.Chromatogr.Sci. 9, 393 (1971)
374. B.S. Finkle, D.M. Taylor, E.J. Bonelli
J.Chromatogr.Sci. 10, 312 (1972)
375. L.B. Foster, C.S. Frings
Clin.Chem. 16, 177 (1970)
376. W.N. French, F.F. Matsui, S.J. Smith
J.Pharm.Sci. 64, 1545 (1975)

377. F.L. Fricke
J.Ass.Offic.Anal.Chem. 55, 1162 (1972)
378. A. Frigerio, K.M. Baker, G. Belvedere
Anal.Chem. 45, 1846 (1973)
379. C.S. Frings, P.S. Cohen
Am.J.Clin.Pathol. 56, 216 (1971)
380. J.A. Gamble, R.A. Assaf, J.S. Mackay,
M.S. Kennedy, P.J. Howard
Anaesthesia 30, 159 (1975)
381. I. G'Anescu, C. V'Arhelyi, G. Gr'Inzan,
L. Boboc
Pharmazie 31, 259 (1976)
382. S. Garattini, F. Marcucci, E. Mussini
In: Gas Chromatography in Biological Medicine,
CIBA Foundation Symposium, 161 (1969)
383. G. Thorpe-Gardner, M.J. Parsonage, P.F.
Smethurst, C. Toothill
Clin.Chim.Acta 36, 223 (1972)
384. J.C. Garriott, A. Stolman
Clin.Toxicol. 4, 225 (1971)
385. J.A. Goldsmith, H.A. Jenkins, J. Grant,
W.F. Smyth
Analyt.Chim.Acta 66, 427 (1973)

386. J.H. Goudie, D. Burnett
Clin.Chim.Acta 55, 133 (1971)
387. G. Gräfe
Dtsch.Apoth.-Ztg. 112, 8 (1972)
388. I. Grecu, S. Barbu
Ann.Pharm.Fr. 26, 405 (1968)
389. G. de Groot, R.A.A. Maes, H.H.J. Lemmens
Arch.Toxikol. 35, 229 (1976)
390. M.R. Hackman, M.A. Brooks, J.A.F. de Silva
Anal.Chem. 46, 1075 (1974)
391. P. Haefelfinger
J. Chromatogr. 111, 323 (1975)
392. D.M. Hailey
J.Chromatogr. 100, 49 (1974)
393. M. Hasegawa, I. Matsubara
Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) 23, 1826 (1975)
394. V. Heidbrink, H.J. Mallach, A. Moosmayer
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 516 (1975)
395. R.B. Hermans, P.E. Kamp
Pharm.Weekbl. 102, 1123 (1967)
396. L.B. Hetland, D.A. Knowlton, D. Couri
Clin.Chim.Acta 36, 473 (1972)
397. D.J. Hoffman, A.H. Chun
J.Pharm.Sci. 64, 1668 (1975)

398. A.G. Howard, G. Nickless, D.M. Hailey
J.Chromatogr. 90, 325 (1974)
399. A. Hulshoff, J.H. Perrin
J.Chromatogr. 129, 249 (1976)
400. M.J. Hutcul, G.F. Wright
Can.J.Pharm.Sci. 3, 4 (1968)
401. E. Jacobsen, T.V. Jacobsen
Anal.Chim.Acta 55, 293 (1971)
402. E. Jacobsen, T.V. Jacobsen
Anal.Chim.Acta 60, 472 (1972)
403. E. Jacobsen, T.V. Jacobsen, T. Rojahn
Anal.Chim.Acta 64, 473 (1973)
404. N.C. Jain, P.L. Kirk
Microchem.J. 12, 229 (1967)
405. P. Jatlow
Clin.Chem. 18, 516 (1972)
406. J.B. Johnson, V.S. Venturella
Bull.Parenter Drug Ass. 25, 239 (1971)
407. P. Juul
Ugeskr.Laeger 128, 115 (1966)
408. K.K. Kaistha
J.Pharm.Sci. 61, 655 (1972)
409. K.K. Kaistha, J.H. Jaffe
J.Pharm.Sci. 61, 679 (1972)

410. L. Kangas, A. Pekkarinen, C. Sourander,
E. Raijola
Ann.Clin.Res. 6, 12 (1974)
411. S.A. Kaplan, M. Lewis, M.A. Schwartz, E.
Postma, S. Cutler, C.W. Abruzzo, T.L. Lee,
R.E. Weinfeld
J.Pharm.Sci. 59, 1569 (1970)
412. E. van der Kleijn, G. Beelen, M. Frederick
Clin.Chim.Acta 34, 345 (1971)
413. E. Kohler
Dissertation Tübingen 1970
414. F.J. Kokoski, S. Hamner, M. Shiplet
Natl.Conf.Methadone Treat.Proc. 2, 1073 (1973)
415. P. Krugers
Pharm.Weekbl. 108, 1025 (1973)
416. P. Lafargue, J.C. Couture
Ann.biol.Clin. (Paris) 32, 443 (1974)
417. P. Lafargue, J. Meunier, Y. Lemontey
J.Chromatogr. 62, 423 (1971)
418. P. Lefargue, P. Pont, J. Meunier
Ann.Pharm.Fr. 28, 477 (1970)
419. S. Lal
Arch.int.Pharmacodyn.Thér. 207, 122 (1974)
420. S. Lauffer, E. Schmidt, F. Weist
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 740 (1969)

421. N.C. Law, H.M. Fales, G.W.A. Milne
Clin.Toxicol. 5, 17 (1972)
422. G. Luisi
Boll.soc.ital.biol.Sper. 49, 983 (1973)
423. A.J. MacBay, E.J. Algeri
Prog.Chem.Toxicol. 1, 157 (1963)
424. A. MacDonald, A.F. Michaelis, B.Z. Senkowski
In: Analytical Profiles of Drug Substances,
edited by K. Florey, Vol. I, New York und
London: Academic Press 1972
425. K. Macek, V. Reh'ak
J.Chromatogr. 105, 182 (1975)
426. H.J. Wallach, A. Moosmayer, J.M. Rupp
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 614 (1973)
427. B.R. Manno, J.R. Baker, J.E. Manno, J.R.
Hughes
J.Forens.Sci. 20, 38 (1975)
428. F. Marcucci
J.Pharm.Sci. 62, 1900 (1973)
429. F. Marcucci, R. Bianchi, L. Airoidi, M.
Salmona, R. Fanelli, C. Chiabrando, A.
Frigerio, E. Mussini, S. Garattini
J.Chromatogr. 107, 285 (1975)
430. F. Marcucci, R. Fanelli, E. Mussini, S.
Garattini
Eur.J.Pharmacol. 9, 253 (1970)

431. F. Marcucci, E. Mussini, E. Airoidi, A. Guatani, S. Garattini
J.Pharm.Pharmacol. 24, 63 (1972)
432. C.M. Martin, H.V. Street
J.Chromatogr. 22, 274 (1966)
433. T. Masuda
J.Kumamoto Med.Soc. 46, 105 (1972)
434. Y. Matsuda
Jap.J.Legal Med. 25, 445 (1971)
435. H.V. Maulding, J.P. Nazareno, J.E. Pearson, A.F. Michaelis
J.Pharm.Sci. 64, 278 (1975)
436. L.B. Metland, D.A. Knowlton, D. Coiri
Clin.Chim.Acta 56, 473 (1972)
437. S. Miachon, L. Revol
C.R.Soc.Biol. 165, 140 (1971)
438. G.W.A. Milne, H.M. Fales, Th. Axenrod
Anal.Chem. 43, 1815 (1971)
439. S.J. Mulé
J.Chromatogr. 39, 302 (1969)
440. S.J. Mulé
J.Chromatogr. 55, 255 (1971)
441. S.J. Mulé, M.L. Bastos, D. Jukofsky, E. Saffer
J.Chromatogr. 63, 289 (1971)

442. B.L. Nielsen, J. Clausen
Ugeskr.Laeger 128, 119 (1966)
443. A. Noirfalise
J.Chromatogr. 20, 61 (1965)
444. H. Oelschläger
Arch.Pharm. (Weinheim) 296, 396 (1963)
445. H. Oelschläger, V. Geppert
Arch.Pharm. (Weinheim) 309, 1000 (1976)
446. H. Oelschläger, E. Kurek, F.I. Sengün,
J. Volke
Z.Anal.Chem. 282, 123 (1976)
447. H. Oelschläger, H.P. Oehr
Pharm.Acta Helv. 49, 179 (1974)
448. H. Oelschläger, F.I. Sengün
Arch.Pharm. (Weinheim) 306, 737 (1973)
449. H. Oelschläger, F.I. Sengün
Arch.Pharm. (Weinheim) 307, 401 (1974)
450. H. Oelschläger, F.I. Sengün
Pharmazie 29, 770 (1975)
451. H. Oelschläger, J. Volke, H. Hoffmann,
E. Kurek
Arch.Pharm. (Weinheim) 300, 250 (1967)
452. H. Oelschläger, J. Volke, E. Kurek
Arch.Pharm. (Weinheim) 297, 431 (1964)

453. H. Oelschläger, J. Volke, G.T. Lim, R. Spang
Arch.Pharm. (Weinheim) 302, 946 (1969)
454. A.R.E.N. Ossmann, A.H.E. Hassany
Pharmazie 30, 257 (1975)
455. B. Peskar, S. Spector
J.Pharmacol.Exp.Ther. 186, 167 (1973)
456. G.F. le Petit
J.Pharm.Sci. 65, 1094 (1976)
457. G.F. le Petit
Z.Anal.Chem. 283, 199 (1977)
458. H.F. Proelss, H.J. Lohmann
Clin.Chem. 11, 222 (1971)
459. C.V. Puglisi, J.A.F. de Silva
J.Chromatogr. 118, 370 (1976)
460. T.A. Rejent, K.C. Wahl
Clin.Chem. 22, 889 (1976)
461. A.J. Rice, W.R. Wilson
Clin.Toxicol. 6, 59 (1973)
462. J.H. Riddick
Clin.Biochem. 6, 189 (1973)
463. D.H. Rodgers
J.Chromatogr.Sci. 12, 742 (1975)
464. J.M. van Rossum, D.D. Breimer, G.A.M. van
Ginneken, J.M.G. van Kordelaar, T.B. Vree
Clin.Chim.Acta 34, 311 (1971)

465. W. Sadée, E. van der Kleijn
J.Pharm.Sci. 60, 135 (1971)
466. S. Saito
Jap.J.Leg.Med. 25, 402 (1971)
467. S. Saito
Nippon Hoigaku Zasshi 25, 402 (1971)
468. E.F. Salim, J.L. Deuble, G. Papariello
J.Pharm.Sci. 57, 311 (1968)
469. M.C. S'Anchez, J. Colom'e, E. Gelp'i
J.Chromatogr. 126, 601 (1976)
470. H. Sawada
Experientia 28, 393 (1972)
471. H. Sawada, M. Fukumoto, H. Yano, A. Hara,
A. Kido
Acta Sch.Med.Univ.Gifu 20, 619 (1972)
472. H. Sawada, A. Hara, S. Asano, Y. Matsumoto
Clin.Chem. 22, 1596 (1976)
473. N. Scagliola, R. Julien, C. Dreux
Ann.Biol.Clin. (Paris) 34, 27 (1976)
474. B. Schubert, G. Malmgren
Opusc.Med. 8, 288 (1969)
475. M.A. Schwartz, P. Bommer, F.M. Vane
Arch.Biochem.Biophys. 121, 508 (1967)

476. P. Schweda
Anal.Chem. 39, 1019 (1967)
477. F.I. Senguen, H. Oelschläger
Arch.Pharm. (Weinheim) ____, 720 (1975)
478. M.F. Sharkey, C.N. Andres, S.W. Snow, A.
Major jr., T. Kram, V. Warner, T.G. Alexander
J.Ass.Offic.Anal.Chem. 51, 1124 (1968)
479. J.A.F. de Silva
Gas Chromatography in Drug Research.
In: Gas Chromatography, p. 252-265, Grune
and Stratton Inc., New York 1968
480. J.A.F. de Silva, L. d'Arconte
J.Forens.Sci. 14, 184 (1969)
481. J.A.F. de Silva, I. Bekersky, M.A. Brooks
J.Pharm.Sci. 63, 1943 (1974)
482. J.A.F. de Silva, I. Bekersky, M.A. Brooks,
R.E. Weinfeld, W. Glover, C.V. Puglisi
J.Pharm.Sci. 63, 1440 (1974)
483. J.A.F. de Silva, I. Bekersky, C.V. Puglisi
J.Pharm.Sci. 63, 1837 (1974)
484. J.A.F. de Silva, I. Bekersky, C.V. Puglisi
J.Chromatogr.Sci. 11, 547 (1973)
485. J.A.F. de Silva, J. Kaplan
J.Pharm.Sci. 55, 1278 (1966)

486. J.A.F. de Silva, N. Munno, N. Strojn
Anal.Chem. 45, 665 (1973)
487. J.A.F. de Silva, C.V. Puglisi
Anal.Chem. 42, 1725 (1970)
488. J.A.F. de Silva, C.V. Puglisi, M.A. Brooks,
M.R. Hackman
J.Chromatogr. 99, 461 (1974)
489. J.A.F. de Silva, N. Strojn, K. Stika
Anal.Chem. 48, 144 (1976)
490. H.E. Sinc, M.J. McKenna, M.R. Law, M.H.
Murray
J.Chromatogr.Sci. 10, 297 (1972)
491. T. Sjoedin, N. Roosdorp, I. Sjoeholm
Biochem.Pharmacol. 25, 2131 (1976)
492. D. Sohn, J. Simon
Clin.Chem. 18, 405 (1972)
493. J.T. Stewart, J.L. Williamson
Anal.Chem. 48, 1182 (1976)
494. J.M. Steyn, H.K. Hundt
J.Chromatogr. 107, 196 (1975)
495. I. Sunshine
Amer.J.Clin.Pathol. 40, 576 (1963)

496. I. Sunshine
Handbook of Analytical Toxicology, The
Chemical Rubber Company, Cleveland (Ohio) 1969
497. J.W. Sutherland, D.E. Williamson, J.G. Theivagt
Anal.Chem. 43, 206 (1971)
498. J.J. Thomas, L. Dryon
J.Pharm.Belg. 19, 481 (1964)
499. J.J. Thomas, L. Dryon
J.Pharm.Belg. 22, 163 (1967)
500. H.L. Thompson, W.J. Decker
Am.J.Clin.Pathol. 49, 103 (1968)
501. R. Truhaut, C. Boudène, J.-R. Claude
Ann.Biol.Clin. 26, 93 (1968)
502. B. Unterhalt, B. Keil, K. Reinhold
Dtsch.Apoth.-Ztg. 111, 1775 (1971)
503. J.C. Valentour, J.R. Monforte, B. Lorenzo,
I. Sunshine
Clin.Chem. 21, 1976 (1975)
504. J. Vessmann, G. Freij, S. Strömberg
Acta Pharm.Suecica 9, 447 (1972)
505. A. Viala, J.P. Cano, I. Angeletti-Philippe
Eur.J.Toxicol. 3, 109 (1971)
506. J.P. Viau
Xenobiotica 3, 589 (1973)

507. N. Wad, H. Rosenmund, E. Hanifl
J.Chromatogr. 128, 227 (1976)
508. F. Weist, E. Schmid
Med.Welt 7, 369 (1969)
509. R. Whelpton, S.H. Curry
J.Pharm.Pharmacol. 27, 970 (1975)
510. J.M. White
Bull.int.Ass.Forens.Toxicol. 10, 4 (1974)
511. C.L. Winek
Clin.Chem. 22, 832 (1976)
512. K. Yamamoto, S. Kuze, S. Murakami, M.
Takeshita
Jpn.J.Anesthesiol. 25, 680 (1976)
513. I.A. Zingales
J.Chromatogr. 61, 237 (1971)
514. J. Hocke
Dissertation Marburg/Lahn 1976
515. E. Kováts
Helv.Chim.Acta 41, 1915 (1958)
516. R.E. Kaiser
Chromatographia 7, 251 (1974)
517. Kettelhack Riker Pharma GmbH: Beipackzettel
zu AJAN^R. Borken/Westf. 1976

518. S. Ebel, M. Kaal
Unveröffentlichte Untersuchungen
519. H.W. Schütz
Beitr.gerichtl.Med. 28, 354 (1971)
520. S. Ebel, G. Herold
Chromatographia 8, 35 (1975)
521. S. Ebel, J. Hocke
J.Chromatogr. 126, 449 (1976)
522. T.J. Delia, M.J. Olsen, G.B. Brown
J.org.Chem. 30, 2766 (1965)
523. G.R. Hansen, R.L. Boyd
J.heterocycl.Chem. 7, 911 (1970)
524. H.P. Sigg, A. Toth
Helv. 50, 716 (1967)
525. J. Subbaraman, L.R. Subbaraman, M.J. Behrman
Biochem. 8, 3059 (1969)
526. J.C. Craig, K.K. Purushothaman
J.org.Chem. 35, 1721 (1970)
527. M. Wotschokowsky
Kontakte (Merck) 1/75, 14 u. 2/75, 3 (1975)
528. M.A. Brooks, M.R. Hackman, R.E. Weinfeld,
T. Macasieb
J.Chromatogr. 135, 123 (1977)

529. Polonovski, M., Polonovski, M.
Bull. Soc. chim. France 41, 1190 (1927)
530. Polonovski, M., Polonovski, M.
Chem. Zbl. 2676 II (1927)
531. Huisgen, R., Bayerlein, F., Heydkamp, W.
Chem. Ber. 92, 3223 (1959)
532. Polonovski, M., Pesson, M., Schmitt, H.
Bull. Soc. Chim. France 15, 392 (1948)
533. Bell, S. C., Sulkowski, T. S., Gochman, C.,
Childress, S. J.
J. Org. Chem. 27, 562 (1962)
534. Bell, S. C., Childress, S. J.
J. Org. Chem. 27, 1691 (1962)
535. Bell, S. C., Childress, S. J.
J. Org. Chem. 29, 506 (1964)
536. Sternbach, L. H., Fryer, R. J., Keller, O.,
Metlesics, W., Sach, G., Steiger, N.
J. med. Chem. 6, 261 (1963)
537. Cramer, F., Seidel, H.
Biochim. Biophys. Acta 72, 157 (1963)

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

In Mainz: Albers, Baier, Bock, Geilmann, Härtter,
Horner, Jacob, Kern, Kollath, Mattauch,
Meyerhoff, Neeb, Rohrbach, Schulz,
Straßmann, Tölg.

In Gießen: Ahlbrecht, Beck, Degkwitz, Dittmar, Ehrlich,
Gosselck, Gruehn, Grüner, Gundlach, Habermann,
Hanle, von Hattingberg, Hoppe, Kröhnke, Müller-
Buschbaum, Neumann, Róka, Scharmann, Schewe,
Seebach, Seidel, Staudinger, Szasz, Weis,
Wellhöner.

In Marburg: Böhme, Buß, Ebel, Haake, Hartke, Knoll,
Krieglstein, Otto, Unterhalt, Wichtl.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Gymnasiallehrern dafür danken, daß sie bereits in den 50er-Jahren einen, wie ich meine, ausgezeichneten kritischen naturwissenschaftlichen Unterricht boten, der meinerseits Interessen für das Studium naturwissenschaftlicher Fächer erweckte.

An Namen sollen genannt werden: Beudt, Fleck, Hoffmann, Kochhan und Pfeifer.

Lebenslauf

10.03.1942 geboren in Ingelheim/Rhein als erstes Kind des kaufmännischen Angestellten Friedrich Karl Gottlieb Schütz und seiner Ehefrau Anna Maria, geb. Bockius

1948 - 1952 Volksschule in Ingelheim-Nord

1952 - 1961 Sebastian Münster-Gymnasium in Ingelheim

28.02. 1961 Reifeprüfung

WS 1961/62 Beginn des Studiums der Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

WS 1965/66 Weiterführung des Studiums der Chemie an der Justus Liebig-Universität Gießen

SS 1966 Beginn der Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Gießen

02.04.1968 Diplom-Chemiker Vorprüfung

05.01.1973 Diplom-Chemiker Hauptprüfung

04.01.1973 Beginn der Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen

SS 1973 Lehrauftrag an der Fachhochschule Gießen

seit SS 1973 Lehraufträge für das Fachgebiet "Ökologischer Kurs" im Fachbereich Humanmedizin der Universität Gießen

seit 1973 Mitglied des Direktoriums des Zentrums für Ökologie im Fachbereich Humanmedizin der Universität Gießen

SS 1975 Beginn des Promotionsstudiums an der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof.Dr.S.Ebel

Ich bin mit der Diplom-Haus-und Ernährungswissenschaftlerin Claudia Schütz, geb.Schöniger, verheiratet und Vater von drei Kindern: Christine (geb.07.01.1967), Christian (geb. 14.11.1971) und Katharina (geb.23.09.1976).

Gahmig-Druck 63 Gießen